

Universitätsspital Zürich
Klinik für Geburtshilfe
Direktor: Prof. Dr. med. R. Zimmermann

Arbeit unter Leitung von PD Dr. med. L. Schäffer und Prof. Dr. E. Beinder

Stressreaktivität von gesunden Neugeborenen nach intrauteriner Nikotinexposition

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Helene Bamert
von Thalwil ZH

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. R. Zimmermann

Zürich 2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Zusammenfassung	5
1.1 Hintergrund	5
1.2 Methoden.....	6
1.3 Resultate.....	6
1.4 Diskussion	6
2 Einführung.....	7
3 Probanden und Methode	11
3.1 Studienkollektiv.....	11
3.1.1 Studiengruppe	11
3.1.2 Ausschlusskriterien	11
3.1.3 Kontrollgruppe	12
3.1.4 Nikotinexponiertes Kollektiv	12
3.2 Speichelentnahme.....	12
3.2.1 Voraussetzungen	12
3.2.2 Ablauf der Speichelentnahme	13
3.3 Analysen von Cortisol und Cortison im Speichel.....	15
3.3.1 Labormethoden	15
3.3.2 Statistische Analysen	16
4 Resultate.....	17
4.1 Klinische Daten des Studienkollektivs.....	17
4.2 Messung der Stressreaktivität anhand von Cortisol und Cortison	20
4.3 Verlauf der Cortisol– und Cortisonkurve	21
4.4 Korrelation mit der Nikotinmenge	24

4.5	Analyse möglicher Einflussfaktoren.....	26
5	Diskussion.....	27
5.1	Wirkung von Nikotin auf die HPA-Achse bei Rauchern.....	27
5.2	Intrauterine Nikotinexposition während der Entwicklung der HPA-Achse.....	30
5.2.1	Modulation der Nikotinrezeptoren bei Intrauteriner Nikotinexposition .	30
5.2.2	Veränderung der Plazenta bei rauchenden Müttern	32
5.3	Wirkung intrauterin erhöhter Glucocorticoidkonzentration während der HPA- Achsen Entwicklung	34
5.4	Studien mit kombinierten Faktoren.....	35
5.4.1	Fetale ACTH-Ausschüttung nach intrauteriner Nikotinexposition	35
5.4.2	Gesteigerte HPA-Reaktivität bei 6 Monate alten Kindern rauchender Mütter	36
5.5	Geschlechterunterschied der HPA-Achsen Beeinflussung durch Glucocortikoide und Nikotin	38
5.6	Schlussfolgerungen	39
6	Quellen- und Literaturverzeichnis	40
7	Dank.....	46
8	Lebenslauf	47

Abkürzungsverzeichnis

11- β -HSD2	11- β - Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
ABER	Auditory Brainstem Evoked Responses -> Hörtest
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
CdCl ₂	Cadmium
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
HPA-Achse	(hypothalamic-pituary-adrenal) Hypothalamus-Hypophysen-Neben-Nieren-Achse
mRNA	(messenger ribonucleinacid) messenger Ribonucleinsäure
nAChR	Nicotinerger Acetylcholin Rezeptor
p.m.	post menstruationem
PVN	Nucleus paraventricularis
rmp	(revolution per minute) Umdrehungen /Minute
SGA	Small for Gestational Age, Für Geburtsalter zu leichte Kinder <10.percentile
SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche

1 Zusammenfassung

1.1 Hintergrund

Verschiedene epidemiologische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen intrauterin ungünstig veränderten Bedingungen und einem im Erwachsenenalter erhöhtem Risiko für die Entstehung von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen. Dieser Zusammenhang scheint unabhängig von äusserlichen „Lifestyle“-Faktoren und genetischem Hintergrund zu sein. So konnte z.B. ein Zusammenhang zwischen geringem Geburtsgewicht und späteren kardiovaskulären und metabolischen Krankheiten gezeigt werden. Dies wird auch als „Theorie der fetalen Programmierung“ bezeichnet. Es besteht die Vermutung, dass während der Fetalperiode, als Folge eines intrauterin veränderten Milieus, verschiedene Regulationssysteme des Körpers eine dauerhafte Fehlanpassung erfahren. Es gibt experimentelle Hinweise, dass die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse (HPA-Achse) und die durch sie ausgelöste und modulierte Stressreaktion dabei eine bedeutende Rolle spielt. Eine persistierend gestörte HPA-Achsen Aktivität könnte massgeblich bei der Entstehung der essentiellen Hypertonie, des metabolischen Syndroms und einer gestörten Glukosetoleranz sowie Diabetes beteiligt sein. Nikotin ist als starker Stimulator der HPA-Achsen Aktivität bei Rauchern bekannt. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass Jungtiere, deren Mütter während der Tragzeit Nikotin ausgesetzt waren, eine andauernde Aktivierung der HPA-Achse zeigten. Hierbei spielt vermutlich die Plazentagängigkeit des Nikotins, aber auch eine Veränderung der placentaren Schranke und die daraus resultierende vermehrte Exposition gegenüber Glucocorticoiden während der sensiblen Phase der Organbildung und Prägung eine entscheidende Rolle.

In der vorliegenden Studie analysierten wir die Aktivität des HPA-Achsen Systems bei normalgewichtigen Neugeborenen, deren Mütter während der Schwangerschaft geraucht hatten mit der Fragestellung, ob diese intrauterine Exposition zu einer Veränderung der HPA-Achsen-Aktivität führt, welche nach der Geburt persistiert und damit dauerhaft gestört sein könnte.

1.2 Methoden

Es wurde Cortisol und Cortison als Marker der HPA-Achsen-Aktivität im Speichel des Säuglings in Ruhe- und nach einem Stressreiz gemessen. Als Stressreiz diente die Blutentnahme an der Ferse für den Guthrie-Test, welche 72 bis 94 Stunden postpartal bei allen Kindern für das Neugeborenenenscreening durchgeführt wird. Es wurden Speichelproben von 33 nikotinexponierten, normalgewichtigen und gesunden Neugeborenen entnommen und mit 70 Kontrollkindern verglichen. Cortisol und Cortison-Werte wurden in Ruhe und 5 bzw. 20 Minuten nach dem Fersenstich analysiert.

1.3 Resultate

Neugeborene der Kontrollgruppe zeigten 20 Minuten nach dem Stressreiz einen signifikanten Anstieg der Cortisol- und Cortison Ausschüttung im Sinne einer physiologischen Stressantwort. Im Gegensatz dazu zeigten die Kinder mit intrauteriner Niktinexposition eine deutliche Suppression der Cortisolantwort. Eine Reaktion auf den Stressreiz blieb bei diesem Kollektiv praktisch vollständig aus. Eine Unterscheidung der Gruppen nach Gestationsalter, Geschlecht und Geburtsmodus zeigte keine signifikanten Unterschiede.

1.4 Diskussion

Neugeborene, die während der fetalen Entwicklung mütterlichem Zigarettenkonsum ausgesetzt waren, zeigen am 4. postpartalen Tag eine Störung der physiologischen Reaktion der HPA-Achse auf einen Stressreiz. Diese Ergebnisse weisen auf eine intrauterin induzierte, postpartal persistierende Störung der HPA-Achsen-Aktivität bei Kindern hin, deren Mütter während der Schwangerschaft geraucht haben. Diese veränderte HPA-Achsen Aktivität könnte einen signifikanten Risikofaktor für die Entstehung von kardio-vaskulären und metabolischen Erkrankungen darstellen.

2 Einführung

Epidemiologische Studien geben Grund zu der Vermutung, dass fetale und frühe postnatale intrinsische und extrinsische Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung haben können und strukturelle wie auch funktionelle Veränderungen verschiedener Regulationssysteme des Organismus induzieren können, welche lebenslang persistieren (Barker et al. 2002; Seckl 2004). Dieses Phänomen wird auch als „fetale Programmierung“ bezeichnet. Zu den Programmierungsmechanismen zählt vor allem eine Veränderung der endokrinen und neurohumoralen Regulation. Im Zentrum unseres Interesses steht die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse (HPA-Achse), da sie massgeblich durch die Ausschüttung von Glucocorticoiden an verschiedenen Regulations- und Differenzierungsvorgängen beteiligt ist. Steroidhormone wie Cortisol können aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaft biologische Barrieren überschreiten und bewirken somit wichtige organisatorische Effekte während der Entwicklung des Organismus (Arai et al. 1968).

Die Möglichkeit einer Modulation der HPA- Achsen Funktion im Erwachsenenalter durch die Einflüsse in der frühkindliche Umgebung wurde schon in den 60er Jahren durch Levine (Levine 1957) beschrieben. Mittlerweile konnte durch verschiedene Studien sowohl im Tiermodell wie auch beim Menschen gezeigt werden, dass eine direkte Korrelation zwischen Plasmacortisolwerten im Erwachsenenalter und dem erhöhten Risiko für eine gestörte Glukosetoleranz, Hypertension und Dyslipidämie besteht (Barker et al. 2002; Levitt et al. 1996; Ward 2004). Mit diesen Resultaten als Grundlage wurde vermutet, dass die HPA- Achsen-Programmierung in utero mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, Insulinresistenz und Diabetes mellitus im späteren Leben in Verbindung stehen könnte (Philips et al. 2005).

Weiter wurde postuliert, dass eine intrauterin erhöhte Glucocorticoid-Exposition auf die Programmierung der fetalen HPA-Achse einen signifikanten Effekt haben könnte. So, dass dies zu einer permanenten Veränderung der HPA-Achsenaktivität führen könnte, sowohl in Ruhe wie auch nach Stressinduktion. Die Veränderung dieser Feineinstellung könnte ein Leben lang zu einer inadäquaten Stressreaktion führen, die ein neues unphysiologisches Gleichgewicht herstellt. Solche erhöhten intrauterinen Glucocorticoidexpositionen können durch maternalen Stress, durch eine verminderte plazentare Deaktivierung von mütterlichem Cortisol oder durch mütterlichen Nikotinkonsum während der Schwangerschaft entstehen.

Obwohl Rauchen dafür bekannt ist verschiedenste gesundheitliche Probleme zu verursachen, raucht ca. ein Drittel der Weltbevölkerung (Mackay 2003). Die historische Differenz bei welcher mehr Männer als Frauen rauchen ist in den jungen Generationen kleiner geworden (Warren et al. 2006). Momentan wird die Anzahl weltweit rauchender Frauen auf 250 Millionen geschätzt. Der Anteil der Frauen, die auch während einer Schwangerschaft das Rauchen nicht unterbrechen ist in den meisten Ländern vergleichbar. In Nordamerika stoppt weniger als ein Drittel das Rauchen während der Schwangerschaft (Kirkland et al. 2000; Kendrik et al. 1996). In den Vereinigten Staaten gaben 10% der Frauen mit einer Geburt im Jahre 2003 zu, während der Schwangerschaft geraucht zu haben (Martin et al. 2005) während in Frankreich 15% der Mütter einen moderaten und 10% einen starken Tabakkonsum während der Schwangerschaft bestätigten (Nabet et al. 2005). In Argentinien rauchen 11% und in Uruguay 18% der schwangeren Frauen (Althabe et al. 2008) und auch in Norwegen rauchten von 2002- 2004 durchschnittlich 13% der Schwangeren täglich (Kvalvik et al. 2008).

Es ist bekannt, dass rauchende Schwangere ein erhöhtes Risiko für Plazenta praevia, vorzeitige Plazentalösung, Fehlgeburt oder vorzeitigen Blasensprung sowie Frühgeburtlichkeit und vermindertes Geburtsgewicht besitzen. Pränatale Nikotinexposition konnte aber auch mit anderen chronischen Pathologien in Verbindung gebracht werden wie neonatale Hirnverletzungen (Pauly et al. 2008), gastrointestinale Dysregulation (Shenassa et al. 2004), Lungenerkrankungen (Stick et al. 1996; DiFranza et al. 2004) und immunologischen Abweichungen (Pachlopnik Schmid et al. 2007). Zigaretten beinhalten eine Vielzahl schädlicher Substanzen wie Kohlenmonoxid, Cyanid, Ammoniak, Vinylchlorid und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Das Nikotin, der Hauptstimulator, aber ist die am besten untersuchte Substanz. Nikotin wirkt wie Acetylcholin auf das zentrale und vegetative Nervensystem, excitatorisch an nicotinischen und inhibitorisch an muscarinischen Rezeptoren. Besonders stark wirkt Nikotin auf die HPA-Achsen Aktivität. Nikotin bewirkt eine Ausschüttung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) im Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus, daraufhin folgt eine Freisetzung des Adrenocorticotropinen Hormones (ACTH) aus der Hypophyse, welches peripher in der Nebennierenrinde die Ausschüttung von Cortisol in Gang setzt (Matta et al. 1998). Cortisol interagiert mit verschiedenen Neurotransmittern, die durch Nikotin ausgeschüttet wurden oder dessen Wirkungskaskade unterhalten wie z.B. Acetylcholin, Norepinephrin, Dopamin und Vasopressin (Koob et Le Moal, 1997). Nach chronischem Nikotinkonsum wurde beobachtet, dass nach einem Stressreiz die HPA-

Achsen-Aktivität und das Ansprechen der Glucocorticoidrezeptoren beim Erwachsenen reduziert ist. Dies weist auf eine Modulation dieses Systems unter chronischen Nikotinkonsum hin (Rohleder and Kirschbaum, 2005).

Nikotin kann die plazentare Schranke problemlos überwinden und ist danach sogar in einer höheren Konzentration als bei der Mutter auch im fetalen Kreislauf und in der Amnionflüssigkeit nachweisbar (Luck et al. 1985; Andres et al. 2000). Die Wirkung des Nikotins führt im Stoffwechsel der rauchenden Mutter zu einer vorübergehenden Erhöhung des im Serum aktiven Cortisols (Hoekfelt, 1961).

Unter physiologischen Bedingungen erreichen nur geringe Mengen mütterlich endogener Glucocorticoide den Fetus, da die Plazenta eine strukturelle und chemische Barriere darstellt. Das plazentare Enzym 11- β -hydroxysteroid-dehydrogenase Typ 2 (11- β -HSD 2) wandelt aktive endogene Glucocorticoide in inaktive Ketonprodukte um und schützt so den Feten vor Glucocorticoidexposition. (Benediktsson et al. 1997).

In Zigarettenrauch sind ausser Nikotin noch andere Substanzen nachweisbar. Von grosser Bedeutung ist hierbei das kanzerogene Schwermetall Cadmium. Dies bewirkt in den Trophoblastenzellen der Plazenta sowohl eine verminderte Expression der 11- β -hydroxysteroid-dehydrogenase Typ 2 als auch eine Reduktion der Aktivität dieses Enzyms, sodass das aktive Cortisol in der Plazenta nicht in minderaktives Cortison umgewandelt werden kann (Yang et al. 2006). Auch Chen zeigte bei Ratten, dass intrauterine Nikotinexposition beim Jungtier zu einer erhöhten Glucocorticoidexposition führt. Einerseits durch den nikotininduzierten, erhöhten Cortisolspiegel des Muttertieres, andererseits durch eine verminderte Aktivität der 11- β -HSD 2 (Chen et al. 2007).

So gelangt bei intrauteriner Nikotinexposition sowohl direkt, via direktes Nikotin, wie auch indirekt, via verminderter Aktivität der 11- β -HSD 2, weit mehr Cortisol zu dem sich noch in der Entwicklung befindenden Feten, als in einer physiologischen nicht nikotinexponierten Entwicklung der Fall wäre.

Glucocorticoide wie Cortisol beeinflussen verschiedene Schritte der physiologischen Reifung und Differenzierung der generellen Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) und der HPA-Achse, deren Zeitfenster Spezies-spezifisch und eng mit der zerebralen Entwicklung gekoppelt ist (Dobbing and Sands, 1979).

In Tierexperimenten führt eine vermehrte Glucocorticoidexposition in dieser sensiblen Phase zu lebenslang anhaltenden Veränderungen der neuroendokrinen Funktionen. Dies vor allem durch eine Veränderung der zentralen Corticosteroidrezeptor-

Regulation und mRNA-Expression des Corticotropin Releasing Hormons (CRH) im Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus (Burlet et al. 2005; Dean, 2001; Levitte and Lindsay, 1996; Welberg and Seckl et al. 2000).

Es wurde zudem gezeigt, dass der Einfluss von Cortisol auf die HPA-Achse abhängig ist vom Zeitpunkt, der Dauer und der Konzentration. Weiter konnte eine geschlechterspezifische Veränderung der HPA-Achsen-Aktivität durch Nicotin bei Ratten beobachtet werden (Rhodes et al. 2001). Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es nur wenige humane Studien mit Daten zur Fragestellung wie sich Nikotin intrauterin auf die Entwicklung der HPA-Achse auswirkt (McDonald et al. 2006).

Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität und Reaktivität der Hypothalamus-Hypophysen- Nebennierenrinden- Achse (HPA-Achse) bei normalgewichtigen Neugeborenen untersucht, welche intrauterin einer konstanten Nikotinexposition ausgesetzt waren. Dies erfolgte mittels Glucocorticoidquantifizierung im Speichel unter Ruhebedingungen und als Reaktion auf einen Stressreiz. Nicht nikotinexponierte Kinder dienten als Kontrollgruppe. Eine postpartal persistierend gestörte HPA-Achsenaktivität aufgrund intrauterinen Nikotineinflusses könnte einen signifikanten Risikofaktor für die Entstehung von Erkrankungen im Erwachsenenalter darstellen.

3 Probanden und Methode

Diese Studie wurde in der Frauenklinik des Universitätsspitals Zürich auf der Abteilung für Geburtshilfe durchgeführt und von der eidgenössischen Ethikkommission genehmigt.

Die Zustimmung zur Studie gaben die Eltern des Neugeborenen nach ausführlicher Information über den Studienablauf mittels schriftlicher Einverständniserklärung.

3.1 Studienkollektiv

3.1.1 Studiengruppe

Als Probanden für unsere Fragestellung qualifizierten gesunde Neugeborene, die folgende Kriterien erfüllten:

- Nikotinkonsum (> 5 Zigaretten/d) der Mutter während der gesamten SS
- Normalgewichtig für Gestationsalter

Das Ausmass des Nikotinkonsums der Mutter wurde im Verlauf der pränatalen Schwangerschaftskontrollen, auf der Gebärabteilung und nach der Geburt anamnestisch erhoben. Als Normalgewicht wurde ein Geburtsgewicht zwischen der 10. und der 90. Perzentile festgelegt.

3.1.2 Ausschlusskriterien

Von der Studie ausgeschlossen wurden Neugeborene mit zu geringem Geburtsgewicht (SGA mit Gewicht < 10. Perzentile). Viele Kinder, welche intrauterin Nikotin ausgesetzt sind, weisen bei der Geburt aufgrund einer intrauterinen Mangelsituation Untergewicht auf. Weil gezeigt wurde, dass eine Beeinflussung der HPA-Achse bei einer Small for Gestational Age Problematik vorliegt (Schäffer et al. 2009), wurden in der vorliegenden Arbeit nur normalgewichtige Kinder mit Nikotinexposition eingeschlossen, um den Einflussfaktor SGA auszuschliessen.

Weiter wurden Kinder mit Makrosomie (Gewicht > 90. Perzentile) oder mit Fehlbildungen ausgeschlossen. Auch Ausschluss bei Substanzabusus (Alkohol oder Drogen) der Mutter wie auch bei Müttern mit HIV oder Hepatitis C. Zudem auch Neugeborene, welche während der Schwangerschaft eine Lungenreifungsinduktion oder postpartal erforderliche Intensivmassnahmen erhalten hatten.

3.1.3 Kontrollgruppe

Für die Kontrollgruppe qualifizierten gesunde Neugeborene mit oben genannten Kriterien deren Mütter während der Schwangerschaft nicht geraucht hatten. Die Kontrollgruppe beinhaltet insgesamt 70 Neugeborene, wobei ein Teil des Kollektivs aus einer früheren Studie stammt (Schäffer et al. 2009).

3.1.4 Nikotinexponiertes Kollektiv

Rekrutiert wurden insgesamt 45 Kinder. Von jedem Neugeborenen wurden 3 Speichelproben entnommen. Um eine aussagekräftige Analyse zu gewährleisten wurden nur diejenigen Probanden einbezogen, bei denen alle 3 Speichelproben eine genügende Menge Speichel erbrachten (ca. 100 µliter). Bei 33 Probanden aus der Nikotingruppe entsprachen alle 3 Speichelproben diesen Kriterien für eine präzise Auswertung.

3.2 Speichelentnahme

Zur Messung des Cortisol- und Cortisonwertes wählten wir eine Methode mit Speichelproben, da die Werte im Speichel mit denen des ungebundenen, aktiven Anteils des Blutplasmas sehr gut korrelieren und im Gegensatz zu Blutserumproben, nicht invasiv sind. Die Vergleichbarkeit der Werte für Cortisol im Speichel und Cortisol im Blutplasma sind sowohl bei Erwachsenen als auch bei Neugeborenen gezeigt worden (Umeda et al. 1981; Woodside et al. 1991; Kahn et al. 1988; Gunnar 1989; Kirschbaum and Hellhammer 1989).

3.2.1 Voraussetzungen

Als adäquates, vergleichbares und reproduzierbares Stressereignis für das Neugeborene wählten wir den Guthrietest (Heel-Prick-Test). Bei dieser routinemässigen Blutentnahme zur Früherkennung verschiedener Stoffwechselerkrankungen wird durch den schmerzhaften Fersenstich eine Stressreaktion ausgelöst. Dieser Test erfolgt 72 bis 96 Stunden nach der Geburt, sodass geburtsbedingte Cortisolschwankungen ausgeschlossen werden können (Stahl et al. 1979). Dieses Vorgehen stellt einen adäquaten Stressreiz für die Aktivierung der HPA-Achse dar und löst beim Neugeborenen einen signifikanten Anstieg des Cortisolspiegels aus (Montagos et al. 1991; Lewis and Ramsay, 1995). Obwohl durch

Studien belegt ist, dass sich der zirkadiane Cortisolrhythmus bei Neugeborenen erst nach einigen Lebenswochen / -monaten einstellt (Santiago et al. 1996; Price, 1983), wurde darauf geachtet, allfällige zirkadiane Schwankungen zu vermeiden und daher die Speichelproben zwischen 8 Uhr morgens und 12 Uhr mittags entnommen. Zum Zeitpunkt der Speichelentnahme hatten die untersuchten Kinder mindestens eine Stunde zuvor keine Nahrung mehr getrunken. So konnte eine Kontamination der Speichelproben mit Muttermilch, was zu veränderten Cortisolwerten führen könnte (Magnano et al. 1989), ausgeschlossen werden. Zudem wurde bei jedem Probanden der Blutzuckerspiegel gemessen, welcher $> 2.5\text{mmol/l}$ sein musste, um eine durch Hypoglykämie induzierte Cortisolausschüttung auszuschliessen.

3.2.2 Ablauf der Speichelentnahme

Bei jedem Probanden wurden 3 Speichelentnahmen durchgeführt. Die erste Entnahme erfolgte ca. 10 Minuten vor dem Guthrietest zur Bestimmung des Ruhewertes (Ausgangswert) und somit Bezugswert für die Analysen. 5 Minuten und 20 Minuten nach dem Stressor Fersenstich wurde jeweils erneut während 5 Minuten Speichel gesammelt. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

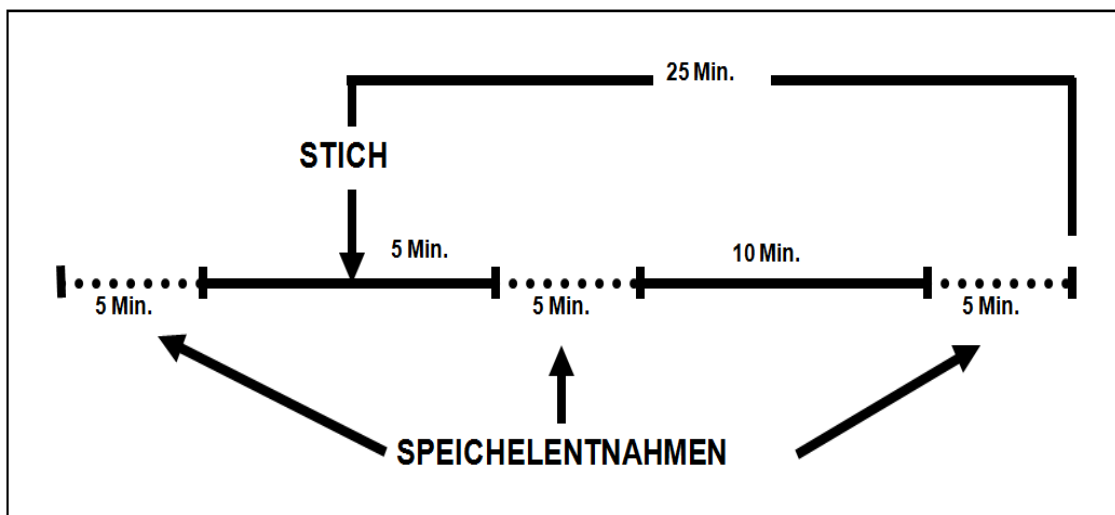


Abb. 1 - Zeitlicher Ablauf der Probeentnahmen.

Während der ganzen Untersuchungsdauer durften die Kinder nicht zusätzlich durch andere Handlungen wie zum Beispiel Gewichtsmessen stimuliert oder irritiert werden, sodass der Stich der einzige Stressreiz darstellte.



Abb. 2 - Speichelentnahme beim Neugeborenen

Jede der 3 Entnahme dauerte exakt 5 Minuten, wobei nach jeweils 2.5 Minuten das Sicherheitswattestäbchen gewechselt wurde, damit genug Speichel gewonnen werden konnte. Mittels der leichten Verdickung im mittleren Bereich des Watteaufsatzes dieser Stäbchen konnte, verglichen mit gängigen Wattestäbchen, mehr Speichel gesammelt werden. Durch das reflexartige Saugen der meisten Säuglinge und das gezielte Ausstreichen der beiden Backentaschen des Mundes konnte die Menge noch zusätzlich gesteigert werden. Für eine zuverlässige Analyse wurden ca. 100 µliter pro Entnahme benötigt.

Abb. 3 - Salivettenröhrchen links und Eppendorfküvetten rechts

Die mit Speichel getränkten Sicherheitswattestäbchen wurden sofort nach jeder Entnahme in beschrifteten Salivettenröhrchen (SARSTEDT-R-Nümbrecht, Deutschland) verschlossen.



Anschliessend wurden die Proben zentrifugiert (Zentrifuge 5810R, 3600u/min, 2160 rmp, 18G, 22°C, 10 min) und anschliessend in Eppendorfküvetten (Easy fit Reaktionsgefäss, Microtubes 1,5ml Nummer 96.07246.9.01) pipetiert und bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Der Zeitraum von Entnahme der ersten Speichelprobe bis Einfrierung im Gefrierschrank betrug nie mehr als 1 Stunde.

3.3 Analysen von Cortisol und Cortison im Speichel

3.3.1 Labormethoden

Das chemische Labor der Kinderklinik Erlangen in Deutschland führte die Analyse der Cortison- und Cortisolwerte aus dem Speichel durch. Die Bestimmung erfolgte mittels Flüssigkeitschromatographie / Tandem-Massenspektrometrie (liquid chromatography tandem mass spectrometry) mit chemischer Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI, atmospheric pressure chemical ionization) im positiven Ionisierungsmodus, gemäss einer modifizierten Methode von Rauh et al (Rauh et al. 2006).

100 µliter der Proben und Kalibratoren wurden mit Methanol/Zink Sulfat (50 g/l, 1/1 v/v) deprotoniert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation auf eine Festphasenextraktionssäule aufgebracht und anschliessend mittels HPLC (high performance liquid chromatography) Technik separiert (Extraktionssäule: Oasis HLB 2.1*20mm, 15ul, Waters, Milford, USA).

Die Proben wurden in 5% Methanol gewaschen und mittels back-flush mit 2mM Ammoniumacetat/ Methanol (30:70, v/v) auf die analytische Säule (Chromolith RP 18e100*4.6mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1ml/min eluiert. Mittels „Multiple Reaction Monitoring Mode“ mit einer Verweilzeit von 150ms pro Kanal wurden die Analysen der Proben durchgeführt, unter Verwendung der folgenden Übergänge für die Qualifizierung (qualifier transition): m/z 363.2/121.2 (363.2/309.4) Cortisol, m/z 361.162.9 (361.239.0) Cortison, m/z 367.3/121.2 Cortisol-d4.

3.3.2 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm STATA 10 (Stata Corporation College Station, TX) berechnet. Als statistisch signifikant wurde $p < 0.05$ definiert. Die Grundcharakteristika der Studien- sowie Kontrollgruppe wurden mit dem Mann-Whitney Test bzw. dem Chi-Quadrat Test verglichen. Die Analyse der baseline Cortisol- und Cortisone Werte erfolgte auch mittels Mann-Whitney Test. Zur Berücksichtigung der intraindividuellen Variabilität wurde zusätzlich ein ANOVA-Test (two-way analysis of variance for repeated measurements) durchgeführt. Um mögliche Einflussfaktoren wie Geburtsgewicht, Gestationsalter und Gewicht unabhängig vom Gestationsalter auf die Studie auszuschliessen, wurde zudem eine schrittweise multiple Regression durchgeführt. Die Beurteilung des Einflusses der Nikotin-Menge erfolgte mittels einer Korrelationsanalyse durch Spearman's rank correlation test. Bei einer fehlenden Normalverteilung der Cortisol- und Cortisonwerte gemäss Shapiro-Francia W' Test wurde die individuelle Differenz der Ruhe- und 20 Minuten-Werte nach dem Stressreiz mit dem Wilcoxon signed rank Test analysiert. Durch die Enzymaktivität von 11- β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2 kann es zu einer Umwandlung von aktivem Cortisol in das inaktive Cortison kommen. Um eine allfällige Änderung der Aktivität dieses Enzyms auszuschliessen, was sich in einer veränderten Umsetzung von Cortisol in Cortison zeigen würde, wurde die Cortisol/Cortison Korrelation anhand des Spearman Rank Test analysiert. Durch die Abschätzung der Aktivität von 11- β -HSD2 konnte ausgeschlossen werden, dass eine zu beobachtende Änderung des Cortisolspiegels die Folge einer Umwandlung von Cortisol in Cortison ist (Dotsch et al. 2000).

4 Resultate

4.1 Klinische Daten des Studienkollektivs

Es wurden insgesamt 81 Mütter angefragt, die anamnestisch während der Schwangerschaft kontinuierlich mindestens 5 Zigaretten/ Tag geraucht hatten und bei deren qualifizierenden Kinder der Guthrie-Test in das morgendliche Zeitfenster fiel. Davon musste 1 Kind wegen sprachlicher Verständigungsprobleme zur Einwilligung ausgeschlossen werden. 7 Mütter gaben bei der Aufklärung zur Studie an, weniger als die anamnestisch erfassten und für die Studie geforderten minimalen 5 Zigaretten konsumiert zu haben. 1 Kind musste in den ersten 72h auf die Neonatologie verlegt werden und qualifizierte somit nicht mehr als gesund. 12 Mütter gingen frühzeitig nach Hause und liessen den Guthrietest dort durchführen. 5 lehnten eine Teilnahme an der Studie ab, 4 zogen ihre Zusage zurück und bei 6 musste der Guthrie-Test wegen erhöhtem Bilirubin ausserhalb des Zeitfensters gemacht werden. Somit blieben 45 Neugeborene bei denen alle Kriterien und Umstände der Probeentnahme erfüllt waren. Bei 33 Säuglingen konnte in allen 3 Probeentnahmen genügend Speichel für eine adäquate Analyse von Cortisol und Cortison gewonnen werden.

In der Kontrollgruppe waren von den 70 Neugeborenen 41 weiblich und 29 männlich. Bei den 33 nikotinexponierten Säuglingen waren 15 weiblich und 18 männlich. Das mediane Geburtsalter betrug bei den Kontrollen 276 Tage p.m. bei den Nikotinkindern 280 Tage p.m. Somit ist das mediane Geburtsalter bei beiden Gruppen vergleichbar. Beim Geburtsgewicht ergab sich für die Kontrollgruppe ein medianer Wert von 3315g, entsprechend der 53,2. Perzentile. Bei den nikotinexponierten Gruppe, welche nicht die SGA-Kriterien, also zu geringes Geburtsgewicht für das Gestationsalter ($< 10.$ Gewichtspersentile) aufweisen durften, betrug das mediane Gewicht 3350g, was der 42.5. Perzentile entspricht. Beim Geburtsmodus ergaben sich für die Kontrollgruppe 23 Sectio cesareas und 47 vaginale Geburten. In der Nikotingruppe kamen 9 per Sectio und 24 per vaginale Entbindung zur Welt. Sowohl bezüglich des Kopfumfanges ($p=0.570$) wie auch der Apgar-Werte bei 1 min ($p=0.222$), bei 5min ($p=0.711$) und bei 10 min ($p=0.715$) konnte kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen festgestellt werden. Bei den Müttern der beiden Gruppen konnte weder beim BMI vor der Schwangerschaft ($p=0.235$) noch vor der Geburt ($p=0.269$) ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Dasselbe gilt für das Alter bei Geburt ($p=0.211$) und die ethnische Zugehörigkeit ($p=0.206$). Maternale Infektionen während der Schwangerschaft konnten ausgeschlossen werden.

Die rauchenden Mütter reduzierten erfreulicherweise meistens bei bekannt werden der Schwangerschaft ihren Konsum und rauchten im Median noch 9 (5 - 30) Zigaretten pro Tag.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollkollektiv und Studienkollektivs bestanden, sodass eine Vergleichbarkeit der Gruppen gegeben ist.

Die klinischen Daten der Gruppen sind in folgenden Tabellen dargestellt:

		KONTROLL- GRUPPE (n=70)	NIKOTIN- GRUPPE (n=33)	p
FETALE DATEN:				
		Absolute Anzahl	Absolute Anzahl	
Geschlecht	Knaben	29 (41.4 %)	18 (54.6 %)	0.212
	Mädchen	41 (58.6 %)	15 (45.4 %)	
		Median (Min/Max)	Median (Min/Max)	
Gestationsalter (d)		276 (240-294)	280 (259-292)	0.242
Geburtsgewicht (g)		3315 (2100-4430)	3350 (2480-4060)	0.601
Gewichtspersentile		53.2 (12.7-91.6)	42.5 (10.8-89.6)	0.450
Kopfumfang (cm)		34.5 (30.5-36.5)	34.3 (25.0-36)	0.570
Apgar- Werte	1 min	8 (3-9)	8 (7-9)	0.222
	5 min	9 (8-10)	9 (8-10)	0.711
	10 min	9 (7-10)	9 (9-10)	0.715
Tabelle 1: Fetale Charakteristika des Studienkollektivs				
cm= Zentimeter. d= Tage. g= Gramm. p= Signifikanz.				

		KONTROLL- GRUPPE (n=70)	NIKOTIN- GRUPPE (n=33)	p
MATERNALE DATEN:				
		Absolute Anzahl	Absolute Anzahl	
Entbindungsmodus	vaginal	47 (67.1 %)	24 (72.3 %)	0.568
	Sectio	23 (32.9 %)	9 (27.3 %)	
Ethnik	kaukasisch	51 (72.9 %)	30 (90.9 %)	0.206
	asiatisch	10 (14.3 %)	1 (3.03 %)	
	orientalisch	5 (7.1 %)	1 (3.03 %)	
	afro-karibisch	4 (5.7 %)	1 (3.03 %)	
		Median (Min/Max)	Median (Min/Max)	
Maternales Alter in Jahren		30.5 (18-39)	29 (18-37)	0.211
Parität		2 (1-4)	2 (1-5)	0.472
Gerauchte Zigaretten/d		0	9 (5-30)	
BMI vor Schwangerschaft		22.4 (16-43.9)	21.5 (16.1-35.3)	0.235
BMI bei Geburt		28.8 (22.4-47.4)	28.2 (22.5-39.1)	0.269
Tabelle 2: Maternale Charakteristika des Studienkollektivs				
d= Tag, p= Signifikanz.				

4.2 Messung der Stressreaktivität anhand von Cortisol und Cortison

In Tabelle 3 sind die Resultate der Messung der Cortisol- und Cortisonwerte im Speichel als Ruhewert sowie im Verlauf der Stressreaktion 20 Minuten nach dem Fersenstich dargestellt. Um auszuschliessen, dass Veränderungen des Cortisolspiegels Folge einer erhöhten Konversion des wirksamen Cortisols in dessen unwirksame oxidierte Form Cortison durch die 11- β -HSD2 ist, wurden sowohl Cortisol- als auch Cortisonwerte bestimmt. Wegen der in der Literatur bekannten, interindividuellen Streuung dieser Werte wurde für die absoluten Messwerte der Median mit „range“ angegeben.

Zum Ausschluss, dass bereits unter Ruhebedingungen eine unterschiedliche Aktivität der HPA Achse vorliegt, welche einen möglichen Einfluss auf die Reaktivität haben könnte, wurden zunächst die Ruhewerte zwischen Studien- und Kontrollgruppe miteinander verglichen. Dies ergab, dass sich der mediane Basiswert für Cortisol und Cortison nicht signifikant zwischen der Kontrollgruppe und der Nikotingruppe unterscheidet (1.3ng/ml (0.09-15.7) vs. 0.9ng/ml (0.04-7.0) für Cortisol, $p=0.1125$; 11.8ng/ml (4.6-44.3) vs. 11.5ng/ml (4.6-26.8) für Cortison, $p=0.5527$, vergl. Tab. 3).

	RUHEWERT	20- MINUTEN- POST STRESS
	Median ng/ml (min/max)	Median ng/ml (min/max)
CORTISOL		
Kontroll- Gruppe	1.3 (0.09/15.7)	2.1* (0.03/24.8) $p = 0.0438$
Nikotin- Gruppe	0.9 (0.04/7.0)	0.77 (0.1/16.4) $p = 0.7749$
CORTISON		
Kontroll- Gruppe	11.8 (4.6/44.3)	17.8* (2.8/76.0) $p = 0.0023$
Nikotin- Gruppe	11.5 (4.6/26.8)	13.0 (3.3/45.1) $p = 0.1891$

Tabelle 3: Cortisol- und Cortisonwerte in Ruhe und nach Stressreiz

* $p < 0.05$ (verglichen mit Messung in Ruhe) Vgl. Ruhewerte: Cortisol $p = 0.1125$, Cortison $p = 0.5527$

4.3 Verlauf der Cortisol- und Cortisonkurve

In Abbildung 4 und 5 sind die individuellen Messwerte sowie die Mediane der Cortisol und Cortisonreaktion der Studien- und Kontrollgruppe illustriert. Die Punkte geben die einzelnen individuellen Werte der Probanden an. Dargestellt sind Ruhewerte und die Werte 20 Minuten nach dem Stressreiz. Wie erwartet, kam es in der Kontrollgruppe im Anschluss an den Stressreiz zu einem signifikanten Anstieg des Cortisols ($p=0.0438$) und des Cortisons ($p=0.0023$) im Sinne einer physiologischen Stressantwort. Bei den intrauterin Nikotinexponierten Neugeborenen hingegen war die Stressantwort deutlich reduziert und es konnte kein signifikanter Anstieg des Cortisols ($p=0.7749$) und des Cortisons ($p=0.1891$) nach Stressreiz festgestellt werden.

Der durchgeführte ANOVA Test für wiederholte Messungen bestätigte die signifikante Cortisolreaktion der Kontrollgruppe ($p=0.016$) und die fehlende Reaktion in der Nikotingruppe ($p=0.357$) nach dem Stressreiz.

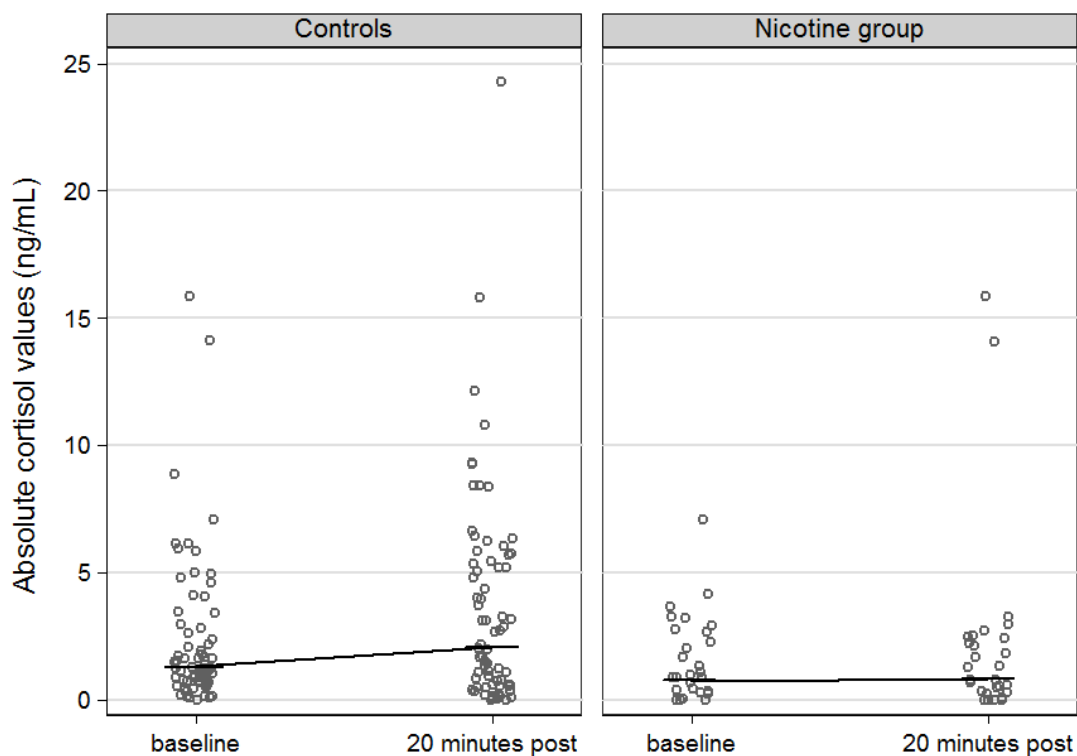


Abb. 4 - Mediane und individuelle Cortisol Werte, Ruhewert und Wert 20 Minuten nach Stressreiz, der Kontroll- und der Nikotingruppe

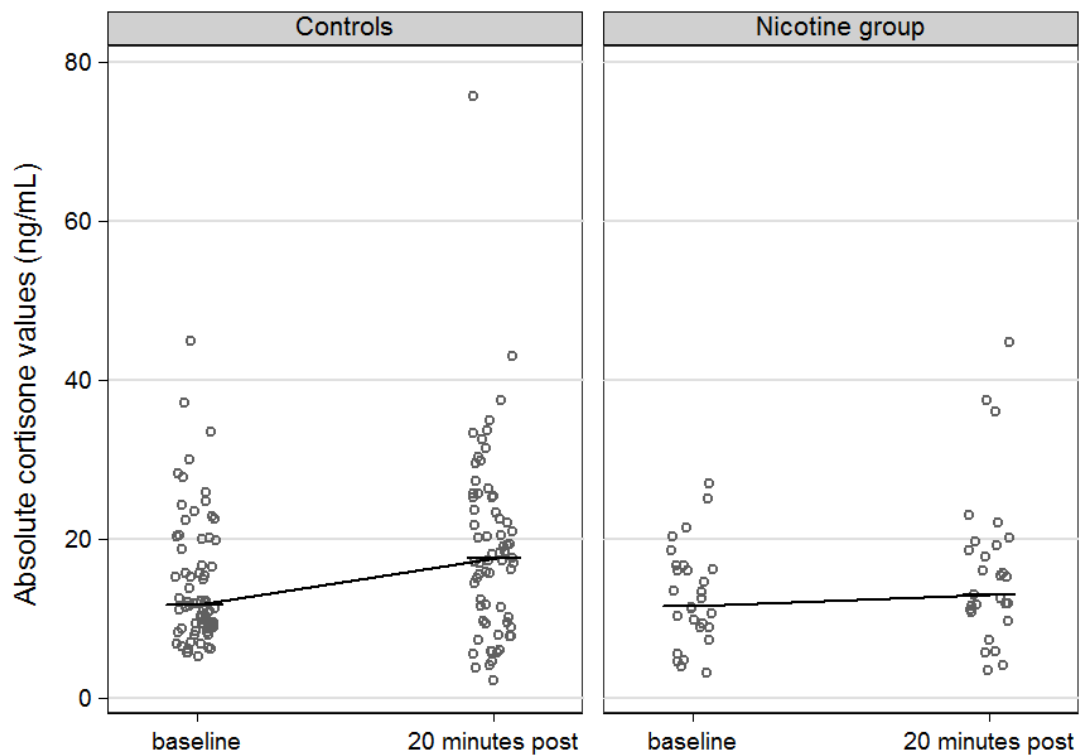


Abb. 5 - Mediane und Individuelle Cortison Werte der Kontroll- und der Nikotingruppe
Ruhewert und 20 Minuten nach Stressreiz

Zur besseren Illustration sind in Abbildungen 6 a und b nochmals die Medianwerte der Cortisol- und Cortisonkonzentrationen dargestellt. Es wird deutlich, dass es bei den Kindern der Kontrollgruppe nach Stressreiz zu einem signifikanten Anstieg der Cortisol- und Cortisonausschüttung kommt. Im Gegensatz dazu bleibt in der Gruppe der intrauterinen Nikotinexposition 20 Minuten nach Stressreiz eine relevante Reaktion der Marker der Stressreaktion aus.

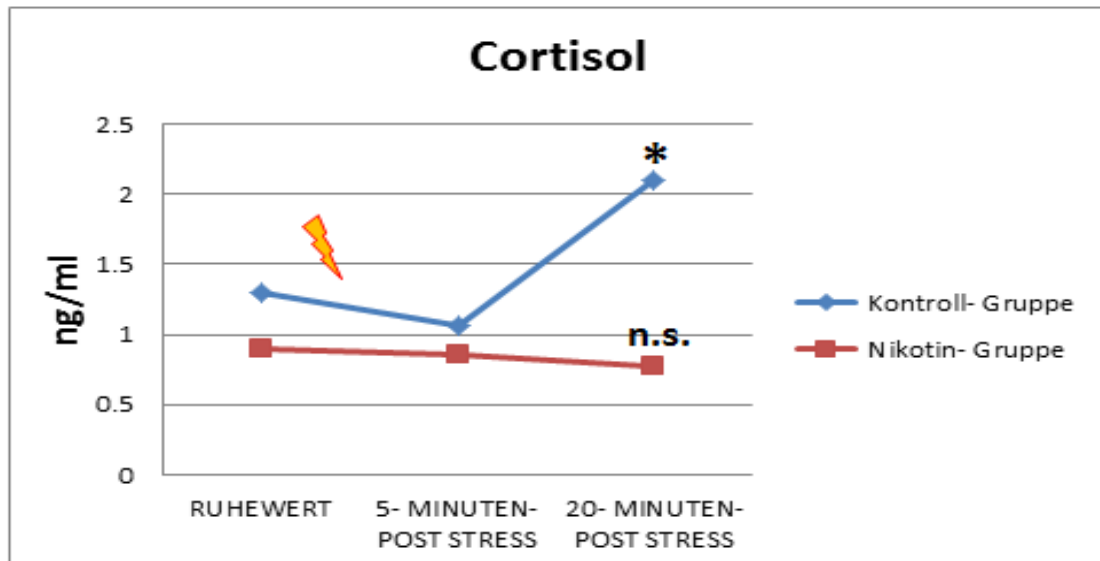
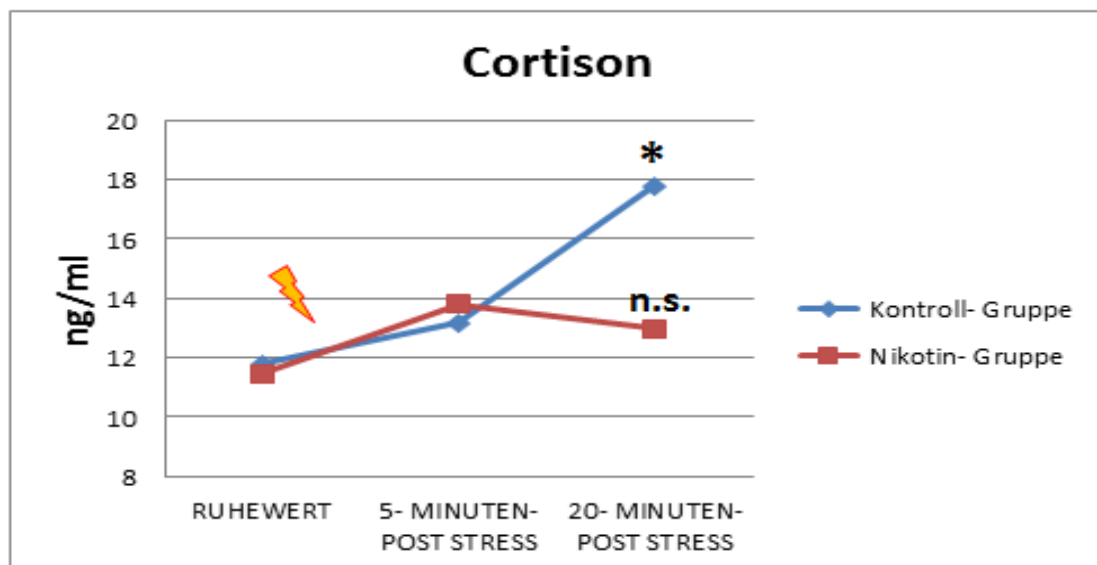
a**b**

Abb. 6 - Verlauf der medianen Cortisolwerte für Kontroll- und Nikotingruppe **a** und Verlauf der Cortisonmesswerte **b**. * = $p < 0.05$, n.s.= nicht signifikant

4.4 Korrelation mit der Nikotinmenge

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Nikotinmenge, d.h. gerauchte Anzahl Zigaretten pro Tag und der HPA-Achsen Reaktion gefunden werden. Es zeigte sich aber, dass bei kleinen Mengen Nikotin die individuelle Streuung noch besteht, während bei Mengen ab 15 Zigaretten/d grösstenteils unter dem Median der Werte liegen.

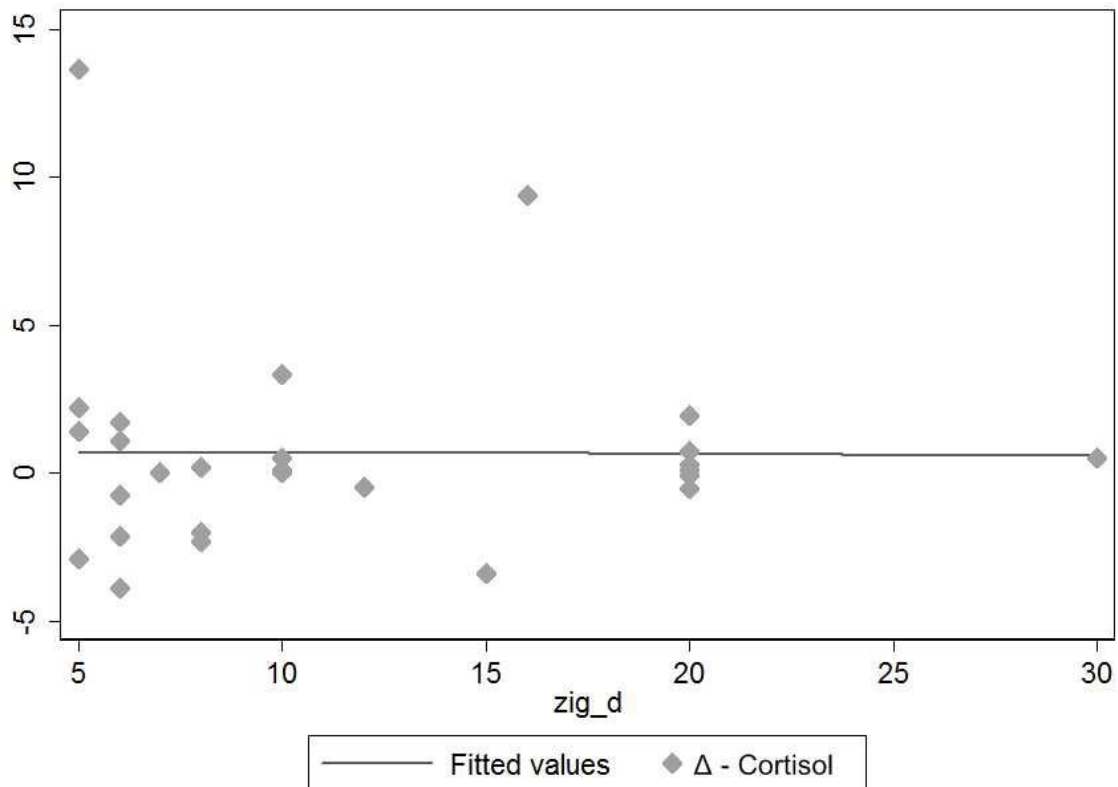


Abb. 7 - Korrelation der Cortisolantwort in Abhängigkeit der Nikotinmenge ($p: 0.0215$, $p=0.9$)

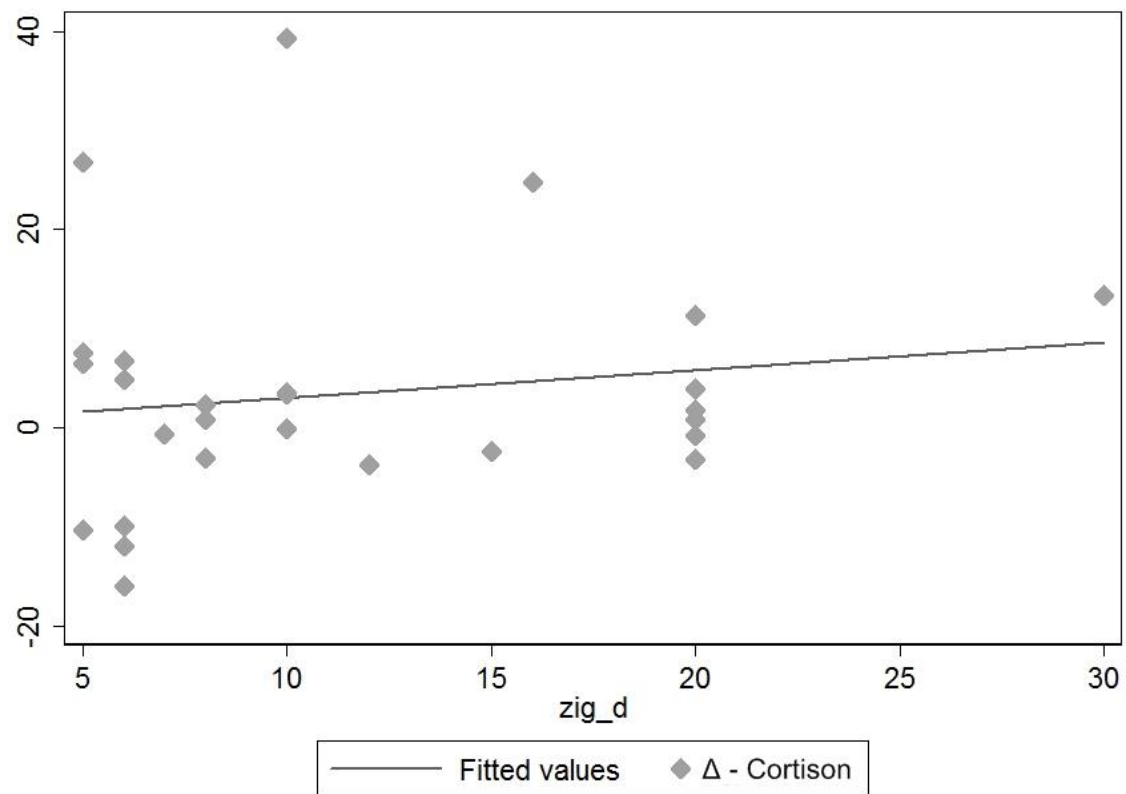


Abb. 8 – Korrelation der Cortisonantwort in Abhängigkeit der Nikotinmenge (ρ : 0.0558, $p=0.76$)

4.5 Analyse möglicher Einflussfaktoren

Zum Ausschluss der Möglichkeit, dass die verminderte Cortisolantwort der Nikotingruppe durch eine erhöhte Konversion von Cortisol in Cortison zumindest teilweise verursacht sein könnte, wurde eine Korrelationsanalyse der Cortisol- und Cortisonwerte durchgeführt, welche eine gute Korrelation zeigte ($p: 0.85$, $p < 0.01$). Aufgrund des gleichmässigen Verlaufes in den beiden untersuchten Gruppen, ist eine signifikante Beeinflussung der Ergebnisse durch eine veränderte Konversionsrate unwahrscheinlich. Für die Beurteilung möglicher relevanter Einflussfaktoren auf die Cortisol- und Cortisonantwort wurde eine multiple schrittweise Regressionsanalyse durchgeführt, die das Gestationsalter, das Geschlecht und das Geburtsgewicht unabhängig von Gestationsalter einschloss. Keiner dieser Faktoren zeigte einen signifikanten Einfluss ($p=0.242$, $p=0.21$, $p=0.45$) auf die Stressreaktion der Neugeborenen in unserem Kollektiv.

5 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei nicht nikotinexponierten, normalgewichtigen, gesunden Neugeborenen am 4. postpartalem Tag zu einer signifikanten Aktivierung der HPA-Achse als Zeichen einer adäquaten physiologischen Reaktion auf einen Stressreiz kommt. Im Gegensatz dazu ist bei nikotinexponierten, normalgewichtigen gesunden Neugeborenen die Stressreaktion, gemessen anhand von Cortisol und Cortison, signifikant supprimiert.

5.1 Wirkung von Nikotin auf die HPA-Achse bei Rauchern

Um zu verdeutlichen, welche Auswirkungen eine intrauterine Nikotinexposition auf das fetale zentrale Nervensystem hat, muss als Basis dessen Wirkung auf die HPA-Achse des erwachsenen Rauchers erläutert werden. Zigarettenrauch enthält verschiedenste Bestandteile, deren vollumfängliche Effekte nur teilweise erforscht sind. Nikotin ist daraus die am besten erforschte Substanz. Durch die Bindung an Acetylcholinrezeptoren beeinflusst Nikotin das zentrale Nervensystem. Besonders stark wirkt Nikotin auf die HPA-Achsen Aktivität. Es bewirkt eine Ausschüttung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) im Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus, daraufhin folgt eine Freisetzung des Adrenocorticotropinen Hormones (ACTH) aus der Hypophyse, welches peripher in der Nebennierenrinde die Ausschüttung von Cortisol in Gang setzt (Matta et al, 1998). Cortisol spielt eine signifikante Rolle als Modulator der ZNS-Vorgänge während einer Stressreaktion. Es interagiert mit verschiedenen Neurotransmittern, die durch Nikotin ausgeschüttet wurden oder dessen Wirkungskaskade unterhalten wie z.B. Acetylcholin, Norepinephrin, Dopamin und Vasopressin (Koob et Le Moal, 1997). Die HPA-Achse ist ein zentrales Organ der Stressregulation mit deren Hilfe wir uns ursprünglich vor äusseren Gefahren schützen konnten. Ihre Aktivierung führt zu einer Erhöhung der Cortisolkonzentration, welche den Organismus auf eine mögliche lebensbedrohliche Situation im Umfeld vorbereitet und somit die Überlebenschancen verbessert.

Der erste Artikel über die Wirkung von Nikotin auf die Sekretion von adrenocorticotiden Hormonen wurde schon 1961 von Hoekfelt publiziert (Hoekfelt 1961). Darin untersuchte er morgendliche (9Uhr, 11Uhr und 13Uhr) Cortisolmessungen im Serum von 6 Personen ohne Nikotin und nach dem Konsum von 2 Zigaretten zwischen 9Uhr und 10Uhr. Dabei konnte er einen deutlichen Cortisolanstieg um 11Uhr unter

Nikotinkonsum zeigen. Dieser Anstieg blieb ohne Nikotin bei allen Individuen aus. So konnte er eine Wirkung von Nikotin auf die Cortisolausschüttung beweisen, was möglicherweise mit einer HPA-Aktivierung durch Nikotin zusammenhängt.

Verschiedene weitere Studien bewiesen die positive Korrelation zwischen Nikotinkonzentration und Plasma Glucocorticoidkonzentration. Zum Beispiel in einem Tierexperiment mit Ratten, denen verschiedene Nikotinkonzentrationen intraperitoneal gespritzt wurden, worauf sich eine nikotinkonzentrationabhängige Corticosteroidreaktion zeigte. Nämlich ein erster Corticosteroidpeak innert der ersten 15min und ein zweiter nach 20min. ACTH zeigte nur einen einzelnen Peak. Die Auslösung der HPA-Achsenaktivität durch Nikotin auf Ebene der Hypophyse verdeutlichte eine Studie, bei welcher eine Hypophysenektomie jegliche HPA-Reaktion verunmöglichte (Cam and Bassett, 1983; Cam et al. 1979).

Matta et al. untersuchte die genaue HPA-Achsen Aktivierung auf Höhe des Hypothalamus. Dabei beobachtete er, dass Nikotin indirekt über noradrenerge Strukturen die Ausschüttung von CRH via parvocelluläre Region des Nucleus Paraventricularis (pcPVN) in Gang setzt. Im Zentrum dabei stehen noradrenerge und andrenerge Bahnen des Nucleus Tractus solitarius (A_2 und C_2), die auf Nikotin reagieren und auf den pcPVN einwirken, damit die HPA-Achse aktiviert werden kann (Matta et al, 1998).

Da Nikotin genau mit diesem Regelkreis interagiert, modifiziert chronische Nikotinexposition auch die basale HPA-Aktivität längerfristig. Es konnte gezeigt werden, dass Raucher verglichen mit Nichtrauchern eine verminderte Cortisol Antwort auf akuten Stress haben (Kirschbaum, 1993; Al'Abis et al. 2003; Roy et al. 1994).Möglicherweise spielt hierbei ein verstärktes negatives Feedback aufgrund der meist hohen Basiscortisolwerte oder eine Abschwächung der Sensitivität der Rezeptoren eine Rolle. Diese Habituation spielt möglicherweise auch bei der von uns untersuchten intrauterinen Nikotinexposition eine Rolle. Denn genau wie bei den adulten Rauchern, waren auch bei unseren Analysen von Neugeborenen die Cortisolantwort auf Stress signifikant reduziert. So konnte gleichwohl in einer Studie an 20 gesunden, nikotinabhängigen Männern mittels Blutanalysen gezeigt werden, dass es nach Rauchen einer Zigarette mit einer niederen Dosis Nikotin ($3.63 \pm 0.59\text{ng/ml}$) zu keinem signifikanten Anstieg von ACTH und Cortisol verglichen mit der individuellen Baseline kam. Anders bei hochdosierten Zigaretten ($23.9 \pm 2.6\text{ng/ml}$). ACTH stieg in signifikantem Ausmass während der ersten 12 Minuten und erreichte seinen Höchstwert 20 Minuten nach Rauchbeginn. Die ACTH Konzentration korrelierte mit der

Nikotinkonzentration im Plasma der Männer. Gleiches wurde für Cortisol gezeigt, welches während 20 Minuten signifikant stieg und nach 60 Minuten seine Höchstwerte im Plasma erreichte (Mendelson et al. 2005).

Wenn eine schwangere Frau Zigaretten raucht, wirken dieselben Einflüsse wie beim Raucher auch auf das ZNS des ungeborenen Kindes, da Nikotin die Plazenta frei passieren kann (Luck et al. 1985). Diese und weitere in späteren Abschnitten erläuterte Veränderungen beeinflussen das intrauterine Milieu in einer Weise, dass fetale Regulationssysteme während ihrer Entwicklung dauerhaft in ihrer Aktivität verändert werden könnten. Auch in unserer Studie konnten wir zeigen, dass die intrauterin nikotinexponierten Neugeborenen nach einem adäquaten Stimulus eine verminderte Cortisolausschüttung zeigten. Die genauen molekularen Mechanismen sind dabei noch unklar. Diskutiert wird eine mögliche Desensibilisierung der nAChR durch die permanente Stimulation in utero. Da das Kind vermutlich einer unphysiologisch erhöhten Cortisolkonzentration ausgesetzt zu sein scheint, verändert dieser Umstand die Ausreifung des eigenen Stresssystems. Wie bei Langzeitrauchern könnte die HPA-Achsenaktivität durch Gewöhnung und Dauereinfluss von Nikotin und Cortisol verändert-, und auf Stressreiz vermindert sein.

5.2 Intrauterine Nikotinexposition während der Entwicklung der HPA-Achse

5.2.1 Modulation der Nikotinrezeptoren bei intrauteriner Nikotinexposition

Neuronale nicotinerge Acetylcholinrezeptoren bestehen aus einer grossen Varietät von Subtypen, welche unterschiedlich die postsynaptische glutaminerge Neurotransmission im ZNS allgemein und des Parasympathikus beeinflussen. In einer Studie aus Schweden untersuchten und verglichen die Forscher die ZNS-Strukturen von Aborten (5.-12.SSW) von Raucherinnen und Nichtraucherinnen. Hierbei konnten sie feststellen, dass es bei Nicht-Nikotin-Exponierten zu einer signifikanten altersabhängigen Zunahme des nicotinischen Rezeptorsubtyps $\alpha 4$ sowohl in der Pons wie auch dem Cerebellum kam,. Zudem wurde in der Pons der Nikotinexponierten Embryos eine signifikante Zunahme der muscarinischen Rezeptoren mit Subtyp m_2 gefunden. In allen untersuchten Regionen konnte nach Nikotinexposition eine Veränderung des Genexpressionsmusters der nicotinischen $\alpha 4$ und $\alpha 7$ Rezeptoruntereinheiten beobachtet werden. Weiter wurden verschiedene Veränderungen der Expression von $m_1 m_2$ der muscarinen mRNA in Pons, m_1 mRNA im Cerebellum und m_3 mRNA in der Medulla festgestellt (Falk et al. 2005). Diese Resultate zeigen, dass Nikotin in utero einen relevanten Einfluss auf die Expression und Modulation von Rezeptoren hat. Die reduzierten cerebralen nACh-Rezeptoren reagieren nicht mehr adäquat auf das ausgeschüttete Acetylcholin, und somit würde die Aktivität der HPA-Achse vermindert werden. Ist die Expression der Rezeptoren durch die intrauterine Exposition strukturell verändert, so änderte das die HPA-Aktivität auf einen Impuls. Die Kaskade der Stressreaktionen könnte dadurch durchaus längerfristig verändert werden Dies wäre eine mögliche Erklärung, wieso in unserer Untersuchung diese Aktivität signifikant reduziert war. Da sich die neuronalen Strukturen in einer plastischen Phase befinden, reagieren sie auf eine Einwirkung von Nikotin besonders empfindlich. Nicht nur verschiedene nicotinerge Rezeptorsubtypen werden durch Nikotin modifiziert, sondern auch andere Rezeptorentypen z.B. muscarine. Die veränderte mRNA hat daraufhin Auswirkungen auf das Endorgan des autonomen Nervensystems. Das Sympathikus-Parasympathikus System ist cerebral von der Lokalisation und der Funktion her eng mit dem HPA-Achsen System verknüpft. So beeinflusst das autonome Nervensystem, welches offensichtlich durch Nikotin beeinflusst wird, die CRH Neuronenstimulation im Nucleus periventricularis sowie die Corticosteroid-Rezeptormodulation im Hippocampus (Hermann et al. 1996; Barbazanges, 1996). In einer anderen Studie am

Tiermodell Ratte wurde untersucht, ob pränatale Nikotinexposition die Aktivität der Nikotinrezeptoren moduliert und verändert. Es konnte gezeigt werden, dass eine pränatale Nikotinexposition die postsynaptische Nikotinrezeptoreinheiten $\alpha 3\beta 2/\alpha 6\beta x$, $\alpha 3\beta 4$ und $\alpha 4\beta 7$ so verändert, dass die Reizung des parasympathischen kardialen Neurons im Nucleus ambiguus und somit der Einwärtsstrom ins Neuron postsynaptisch vereinfacht wird und zu einer stärkeren Aktivierung führt (Huang et al. 2004; Kamendi et al. 2006). Zudem wurde beobachtet, dass nach intrauteriner und perinataler Nikotinexposition die Anzahl nAChRezeptoren im ZNS ansteigt, da wahrscheinlich eine kompensatorische Reaktion auf die Gewöhnung der Rezeptoren stattfand (Tizabi et al. 1997; Miao et al. 1998; Tizabi and Perry, 2000). In unserer Untersuchung konnten wir postpartal eine verminderte Aktivität messen. Eine kompensatorische Reaktion wäre aber durchaus denkbar und würde auch eine Erklärung bieten, wieso das Risiko für kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen steigen könnte. Miao et al. untersuchte die zerebrale Expression von mRNA für nAChR an Ratten, die neonatal von Tag 1 bis Tag 21 mit Nikotin subkutan behandelt wurden. Ein Grossteil der cerebralen Entwicklung fandete bei der Ratte während der ersten 2 Wochen postpartal, beim Menschen jedoch noch intrauterin statt (Dobbing and Sands, 1979; Dent et al. 2000; Challis and Matthews et al. 2000). Generell fand eine Vermehrung der Rezeptoren statt. Bei einer Nikotin Behandlung kurz nach Geburt wurde diese Vermehrung nach einer Woche Abstinenz wieder gleich der Anzahl Rezeptoren wie bei der Kontrollgruppe. Hingegen bei der Gruppe Tag 8 bis Tag 16 beobachtete man einen irreversiblen Anstieg der Nikotinrezeptoren in verschiedenen Hirnbereichen. Auch im Thalamus zusammen mit dem Hypothalamus beobachtbar. Diese, wie auch unsere Resultate deuten darauf hin, dass pränatale Nikotinexposition durch die nicotinerge Überstimulation schon intrauterin die zerebralen Strukturen und die Entwicklung beeinflusst.

Die HPA-Achsen Entwicklung und die Reifung anderer neuralen Strukturen laufen möglicherweise trotz der engen Kopplung nicht gleichzeitig ab und könnten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien verschieden empfindlich auf Nikotineinwirkungen reagieren. Darum haben wir nur Raucherinnen in die Studie aufgenommen, die in während der gesamten Schwangerschaft gleichmässig viele Zigaretten geraucht hatten, damit ein konstanter, phasenunabhängiger Einfluss statt fand.

5.2.2 Veränderung der Plazenta bei rauchenden Müttern

Unter physiologischen Bedingungen erreichen nur geringe Mengen mütterlich endogener Glucocorticoide den Fetus. Das plazentare Enzym 11- β -hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD 2) wandelt aktive endogene Glucocorticoide in inaktive Ketonprodukte um und schützt so den Feten vor einer exzessiven Glucocorticoidexposition (Benediktsson et al. 1997).

In Zigarettenrauch sind ausser Nikotin noch andere Substanzen nachweisbar. Von grosser Bedeutung ist hierbei das kanzerogene Schwermetall Cadmium. Yang et al. untersuchten anhand von humanen Trophoblasten-Zellkulturen aus problemlosen Schwangerschaften die zeit- und dosisabhängige Wirkung von Cadmium (CdCl_2) auf die 11 β -HSD 2 Aktivität, das Protein, der mRNA und die Promotoraktivität. Zudem verglichen sie Cadmium mit anderen metallischen Substanzen wie Zinkchlorid, Magnesiumchlorid und Manganchlorid um einen Hinweis auf die Spezifität zu gewinnen. Die mit 1.0 μmol CdCl_2 inkubierten Zellen zeigten nach 3h nur noch 70%, nach 24h nur noch 20% der Enzymaktivität. Das heisst, dieser Zigarettenbestandteil bewirkt in den Trophoblastenzellen der Plazenta sowohl eine signifikant verminderte Expression der 11- β -hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 als auch eine Reduktion der Aktivität dieses Enzyms, sodass das aktive Cortisol in der Plazenta nicht in minderaktives Cortison umgewandelt werden kann (Yang et al. 2006). Das bedeutet, dass die Plazenta unter Nikotinexposition die protektive Funktion auf den Feten verliert und dieser, und somit seine in Entwicklung befindende HPA-Achse, erhöhten Cortisolwerten ausgesetzt sein würde. Das könnte einer der Faktoren sein, welcher die Aktivität der Achse beeinflussen.

In einer Studie verabreichten Chen et al. trächtigen Ratten durch subkutane Injektionen Nicotin. An Tag 8, 15 (Mitte der Trächtigkeit) und 21 (Ende der Trächtigkeit). Im Anschluss wurde die Plazenta sowie die Nebennieren der Mütter und der Jungtiere analysiert. Dabei bestimmten sie maternale Corticosteronkonzentrationen, mRNA Expression von adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR) und Zytochrom P450 cholesterol side chain cleavage (P450ssc) bei Mutter und Jungtier sowie plazentaler mRNA der 11- β -HSD-2. Das StAR transportiert Cholesterin in die Mitochondrien und p450ssc spaltet daraufhin eine Seitenkette desselben ab. Dies ist der erste enzymatische Schritt zur Steroidsynthese. Unter anderem findet diese Produktion in der Nebennierenrinde statt. Somit sind diese Werte Parameter für das Ausmass der Glucocorticoidsynthese. Es wurde in der Mittel- und Spättragezeit nach Nikotinexposition eine Erhöhung der Corticosteronkonzentration festgestellt. Die mRNA der StAR und die P450ssc waren in den maternalen Nebennierenrinden signifikant erhöht, reduziert hingegen bei den fetalen Messungen. Zudem war die mRNA der 11- β -HSD-2 der nikotinexponierten Plazenten im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt (Chen et al. 2007). Diese Resultate weisen darauf hin, dass ein Zusammenhang bestehen könnte zwischen erhöhten maternalen Glucosteroidkonzentrationen und einer Veränderung der fetalen Glucocorticoidbildung, möglicherweise induziert durch das negative Feedback übermässig erhöhter Cortisolwerte. Zusätzlich geben sie einen Hinweis darauf, dass die 11- β -HSD-2 Aktivität nicht nur durch Cadmium im Zigarettenrauch sondern auch durch direkte Wirkung des Nikotins an der Plazenta verändert sein könnte.

So gelangt bei intrauteriner Nikotinexposition sowohl direkt wie auch indirekt weit mehr Cortisol zu dem sich noch in der Entwicklung befindenden Feten als in einer physiologischen nicht nikotinexponierten Entwicklung der Fall wäre.

Es bestehen ferner zudem hämatologische und vaskuläre Aspekte des Rauchens während der Schwangerschaft. Da das beim Rauchen gebildete CO besser an Hämoglobin bindet als CO₂, erfährt der adulte Raucher eine leichte Hypoxie. Da fetales Blut nur 20 bis 30% der adulten Oxygenation aufweist, kann eine reduzierte Oxygenation bei trächtigen Schafen eine relevante Hypoxie beim fetalen Jungtier auslösen (Longo, 1976). Diese intrauterine Sauerstoffmangelsituation könnte eine verstärkte Stressreaktion auslösen. Durch Nikotin wird zudem eine Vasokonstriktion der Gefässe ausgelöst, was speziell an den plazentaren Gefässen zu relevanten

Folgen mit Hypoxie führen könnte. Durch diesen hypoxischen Stress könnte beim Feten zusätzlich eine Aktivierung der HPA-Achse mit daraus resultierender Cortisolausschüttung stattfinden.

5.3 Wirkung intrauterin erhöhter Glucocorticoidkonzentration während der HPA-Achsen Entwicklung

Sowohl die HPA-Achse wie auch deren hauptsächlichen Regulator im limbischen System, der Hippocampus, sind sensitiv für Glucocorticoide. Es ist anzunehmen, dass diese in sehr hohen Konzentrationen beim Feten vorhanden sind: Durch den Zigarettenkonsum der Mutter werden bei ihr vermehrt Glucocorticoide in Form von Cortisol ausgeschüttet. Das Cortisol wiederum wird durch die veränderte 11- β HSD2 nicht abgebaut und tritt hochwirksam auf den Feten über. Zusätzlich löst das freipassierbare Nikotin beim Feten dieselbe Glucocorticoidausschüttung wie bei der Mutter aus. All diese Faktoren beeinflussen die empfindliche Entwicklung der durch Feedback regulierten HPA-Achsen Entwicklung im Sinne einer Desensibilisierung. Als molekulare Mechanismen dieser Veränderung werden Modulationen von Glucocorticoidrezeptoren (GR) und Mineralcorticoidrezeptoren (MR) auf allen Stufen der HPA-Achse diskutiert, was zu einer Abschwächung der Reaktion führen könnte (Jacobson and Sapolsky 1991). Studien an Ratten zeigten eine abgeschwächte GR und MR Expression im Hippocampus nach einer vermehrten intrauterinen Glucocorticoidexposition. Die daraufhin permanent erhöhten Cortisolwerte und die im späteren Erwachsenenleben vorhandene arterielle Hypertonie deuten darauf hin, dass die sensible negative Feedback-Regulation der HPA-Achse gestört sein könnte (Levitt, Lindsay et al 1996). Im Hinblick auf die spätere Gesundheit ist es wichtig alle relevanten Faktoren zu eruieren und wenn möglich zu minimieren.

Die HPA-Achse ist aber nicht der einzige neurale Angriffspunkt. Auch die Amygdala, welche wesentlich an der Entstehung der Angst beteiligt ist und allgemein eine wichtige Rolle bei der emotionalen Bewertung und Wiedererkennung von Situationen sowie der Analyse möglicher Gefahren spielt, interagiert mit der HPA-Achsen abhängigen Stressregulation durch Corticotropin Releasing Hormon (CRH) Übermittlung (Feldmann and Weidenfeld 1998). Auch dieses System ist empfindlich gegenüber antenataler Glucocorticoidexposition. Es zeigte sich danach bei Ratten eine permanente Erhöhung von CRH und der GR und MR, was auf eine erhöhte Aktivierung hinweist (Welberg, Seckl et al. 2000; Welberg, Seckl et al. 2001). In einer anderen Studie im Tiermodell zeigten knock-out Mäuse mit einer Deaktivierung der GR im zentralen Nervensystem

eine gestörte HPA-Achsen Regulation mit erhöhten Glucocorticoidwerten, eine verminderte Stressantwort sowie ein vermindertes Angstgefühl (Tronche et al. 1999).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine permanente Veränderung dieser Rezeptoren eine Modulation oder Neueinstellung der Balance und der Reaktivität der HPA-Achse im späteren Leben bedeuten könnte. Die HPA-Achsen Programmierung und Regulation ist hoch komplex und es sind noch nicht alle Mechanismen und deren Auswirkungen vollständig bekannt und verstanden. Vor dem Hintergrund, dass die HPA-Achse stark in die kardiovaskuläre und metabolische Homöostase eines Organismus involviert ist, ist es naheliegend, dass eine permanente Veränderung der Aktivität und der Balance während der Entwicklung und dem Leben eine Auswirkung auf die Gesundheit haben könnte. In der Tat stehen erhöhte Cortisolwerte in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von Arteriosklerose und Diabetes (Sapolsky, Romero et al. 2000).

5.4 Studien mit kombinierten Faktoren

5.4.1 Fetale ACTH-Ausschüttung nach intrauteriner Nikotinexposition

Unser Modell der durch Nikotin in utero veränderten Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse stützen auch andere Studien: In einer Studie von McDonald et al. 2006 wurde in einer prospektiven Kohortenstudie die Wirkung intrauteriner Nikotinexposition auf die HPA-Achse untersucht. Sie quantifizierten den ACTH-Gehalt in arteriellem und Cortisolgehalt in venösem umbilicalem Nabelschnurblut unmittelbar nach einer elektiven Sectio cesarea zwischen 8:30 und 11:30 Uhr. Die Schwangerschaft musste problemlos verlaufen sein, d.h. ohne Gestationsdiabetes, ohne Stereoidennahmen, maternalen Infektionen oder gemischtem maternalen Drogenkonsum. Zudem mussten die Kinder über der 10. Gewichtsperzentile liegen. Es wurden 21 nikotinexponierte Kinder mit täglichem Zigarettenkonsum der Mutter von im Median 12 Zigaretten/d und 83 nicht nikotinexponierte Kinder eingeschlossen. Die Messung ergab eine signifikante Erhöhung von ACTH bei den Nikotinkindern verglichen mit der Kontrolle (17 pmol/l vs. 4 pmol/l; $p=0.005$). Für Cortisol jedoch konnte kein Unterschied entdeckt werden (182 nmol/l vs. 192 nmol/l; $p=0.541$ arteriell und $p=0.346$ venös). Die umbilicale ACTH-Konzentration korrelierte nicht mit der des maternalen Cotinins, ein Abbauprodukt des Nikotins, jedoch mit den fetalen Geburtsgewichten (McDonald et al. 2006). Diese Studie untersuchte die HPA-Achsen Funktion jedoch unmittelbar postpartal. Zudem wurde nur ein potentieller Ruhe-Wert

gemessen aber keine Reaktivität, weswegen die HPA-Achsen Aktivität und Reaktivität nicht adäquat beurteilt werden kann.

5.4.2 Gesteigerte HPA-Reaktivität bei 6 Monate alten Kindern rauchender Mütter

Mit der Frage, ob sich auch Passivrauch auf die HPA-Achsen Reaktivität auswirkt, untersuchten Granger et al. den Cortisolwert im Speichel bei 197 6-Monate alten Säuglingen während einer Impfung. Anhand von Selbsteinschätzung der Mutter zu ihrem Rauchverhalten und den Cotininwerten ($> 10\text{ng/ml}$, Media: 252ng/ml) im Speichel der Mutter wurden deren Kinder in nicht Passivrauchexponierte ($n=115$) und Passivrauchexponierte ($n=82$) Kinder eingeteilt. 5 Minuten vor- beziehungsweise 20 und 40 Minuten nach der Impfung in den Oberarm wurde je eine Speichelprobe gewonnen und der Cortisolwert bestimmt. Interessanterweise gab es bei den Passivrauchexponierten einen signifikant stärkeren Anstieg von Cortisol 6 Monate postpartal als bei den nicht Passivrauchexponierten. Sowohl die rauchenden Mütter, wie auch deren 6 Monatige Kinder hatten einen erhöhten Cortisolspiegel verglichen mit der Kontrollgruppe (Granger et al. 2007). Nur 12,3% der RaucherKinder wurden noch gestillt, 10,6% bei den nichtexponierten. Somit ist bei knapp 87% dieser exponierten Kinder eine Versorgung mit Nikotin und Cortisol durch die Muttermilch nicht gegeben. Die Untersucher interpretierten diese Resultate als Auswirkungen von Passivrauch in der kindlichen Umgebung ohne Berücksichtigung der Schwangerschaft. Deshalb gab es leider keine Hinweise auf Nikotinkonsum während der Schwangerschaft. Es darf aber angenommen werden, dass ein Grossteil dieser Mütter auch während der Schwangerschaft geraucht hat. Für unsere Vermutung, dass intrauterine Nikotinexposition einen Einfluss auf die Modulation der HPA-Achse hat, ist dieser Anstieg 6 Monate postnatal eine interessante Beobachtung. In unserer Studie konnten wir nachweisen, dass am 4. postpartalen Tag, also nach Beendigung der intrauterinen Nikotinexposition, eine verminderte Cortisolausschüttung stattfindet. Möglicherweise durch eine HPA-Achsen-Modifikation. 6 Monate später hingegen scheint dieses System auf einen Stressreiz verstärkt zu reagieren. Dies könnte an einer Exposition mittels Passivrauch, aber auch aufgrund einer intrauterin veränderten HPA-Programmierung verursacht sein. Interessanterweise scheint es bereits wenige Monate nach der Geburt zu einer Umkehr der HPA-Achsenaktivität zu kommen. Diese Studie bestärkt die Vermutung, dass eine intrauterine Nikotin Einwirkung die HPA-Achse in eine falsche Balance bringt, welche sich dann später gesundheitsschädigend

auswirken könnte. Da dieser unphysiologische Zustand über den Mechanismus einer intrauterinen Prägung dieses Systems möglicherweise dauerhaft bestehen bleibt, könnte diese Veränderung an der Entwicklung von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen beteiligt sein. In unserer Studie konnten wir eine verminderte Cortisolausschüttung auf einen Stressreiz 4 Tage postpartal beobachten. D.h. die HPA-Achse könnte wegen eines intrauterin erhöhten Reizes auf eine minimale Eigenaktivität programmiert sein. Vorstellbar wäre, dass nach dem Wegfall der exogenen/intrauterinen Reize/Noxen die kindliche HPA-Achse ein Mangel durch subjektiv empfundene, verminderte Stimulation erlebt. Und daraufhin vermehrt Rezeptoren sezerniert oder Rezeptoren moduliert, um dieses intrauterine Reizlevel auch postpartal halten zu können. Anscheinend verändern sich die Prozesse der HPA-Achse schon einige Monate postpartal von Suppression zu Überreaktion. Diese im Verlauf der Kindheit unphysiologisch erhöhten Werte könnten ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen mit sich bringen.

5.5 Geschlechterunterschied der HPA-Achsen Beeinflussung durch Glucocortikoide und Nikotin

Es gibt Hinweise darauf, dass das Geschlecht möglicherweise eine Rolle für die spezifische HPA-Achsen- Antwort spielt. Eine Studie an Ratten zeigte, dass eine antenatale Gabe von Glucocorticoiden bei Männchen zu einer verstärkten ACTH- und Corticosteroidausschüttung führte. Bei den Weibchen hingegen kam es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. In diesem Fall konnte eine geschlechterspezifische Veränderung der kardiovaskulären und metabolischen Regulation festgestellt werden (O'Regan, Kenyon et al. 2004). In einer anderen Studie wurde eine unterschiedliche Expression der Glucocorticoidrezeptoren im Hippocampus, Hypothalamus und der Nebennierenrinde beobachtet (Matthews 2000, Seckl 2004) und es scheint, als verlauge bei Weibchen die Programmierung der HPA-Achse empfindlicher als bei Männchen (Weinstock, Matlina et al. 1992, McCormick, Smythe et al. 1995). Diesen Resultaten stehen andere Angaben gegenüber. Zum Beispiel wurde in einer Studie mit Ratten festgestellt, dass männliche Ratten nach Injektion von Nikotin (also direkte Nikotinwirkung, nicht intrauterin) eine signifikant grössere dosisabhängige Arginin-Vasopressin Antwort hatten als die Weibchen. Diese wiederum reagierten mit einer signifikant höheren Ausschüttung von ACTH und Corticosteroiden als ihre männlichen Kontrollen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die zentralen nicotinergen Rezeptoren in Weibchen und Männchen die HPA-Achse unterschiedlich modulieren (Rhodes et al. 2001). Wenn man diese beiden Studien vergleicht, einerseits die intrauterine Glucocorticoid Wirkung auf die HPA-Achse, andererseits die direkte Nikotinwirkung an den Rezeptoren, fällt auf, dass sowohl die vasoaktive als auch die Cortisol Reaktion bei den Geschlechtern genau gegenteilig ausfiel. In unserer Studie, wo beide Einflussfaktoren kombiniert wurden, fiel der Geschlechterunterschied nicht signifikant aus. Es wäre möglich, dass sich diese beiden geschlechtsspezifischen Einflüsse auf die Achse unter diesen Umständen wieder ausgleichen. So, dass wir bei den Cortisol und Cortison-Analysen keine Differenz mehr ausmachen konnten. Es ist dennoch zu beachten, dass die Feinregulation bestimmter Systeme möglicherweise geschlechterspezifisch sein könnte und erst im späteren Leben nach Einsetzen geschlechtsspezifischer Hormonregulation klinisch manifest werden könnte.

5.6 Schlussfolgerungen

Diese Studie ist nach unserer Kenntnis die erste, welche die Aktivität und Reaktivität der HPA-Achse auf einen Stressreiz bei nikotinexponierten, normalgewichtigen Neugeborenen untersucht. Neugeborene mit intrauteriner Nikotinexposition zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Suppression der HPA-Achsen Aktivität. Wir konnten zeigen, dass die HPA-Achse nach intrauteriner Nikotinexposition postpartal verändert bleibt. Möglicherweise spielt dabei eine Kombination aus direkter zentraler Wirkung durch Nikotin und eine durch veränderte Plazentaschranke erhöhte fetale Cortisolexposition eine Rolle. Eine intrauterin durch Nikotin induzierte und postpartal persistierende Veränderung der HPA-Achsen Aktivität, könnte ein relevanter Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen darstellen und sollte daher bei der Beratung von schwangeren Frauen hinsichtlich der Eigenexposition mit Noxen berücksichtigt werden.

6 Quellen- und Literaturverzeichnis

Al'Absi M, Wittmers EL, Erickson J, Hatsukami DK and Crouse B. Attenuated adrenocortical and blood pressure responses to psychological stress in ad libitum and abstinent smokers. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74: 401-410, 2003

Althabe F, Colomar M, Gibbons L, Belizan JM, Buekens P. Smoking during pregnancy in Argentina and Uruguay. *Medicina (Buenos Aires)* 68:48-54, 2008

Andres RL, Day MC. Perinatal complications with maternal tobacco use. *Semin. Neonatol.* 5: 231-241, 2000

Arai Y and Groski RA. Critical Exposure time for androgenization of the developing hypothalamus in the female rat. *Endocrinology* 82: 1010-1014, 1968.

Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M and Maccari S, Maternal Glucocorticoid Secretion Mediates Long-term Effects of Prenatal Stress, *The Journal of Neuroscience* 16(12):3943-3949

Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T and Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int. J. Epidemiol.* 31: 1235-1239, 2002

Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR and Seckl JR. Placental 11beta-hydroxysteroid-dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 46:161-166, 1997

Britton AF, Vann RE and Robinson SE. Perinatal nicotine exposure eliminates peak in nicotinic acetylcholine receptor response in adolescent rats. *JPET* 320: 871-876, 2007

Burlet G, Fernetta B, Blanchard S, Angel E, Trankosic P, Maccari S and Burlet A. Antenatal Glucocorticoids blunt the functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of neonates and disturb some behaviors in juveniles, *Neuroscience* 133: 221-230, 2005

Cam GR and Bassett JR. The plasma levels of ACTH following exposure to stress or nicotine, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 264: 154-167, 1983

Cam GR, Bassett JR and Cairncross KD. The action of nicotine on the pituitary-adrenal cortical axis, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 237:49-66, 1979

Challis JRG, Matthews SG et al. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev.* 21(5): 514-550, 2000

Chen M, Wang T, Liao Zx, Pan XI, Feng YH and Wang H. Nicotine-induced prenatal overexposure to maternal glucocorticoid and intrauterine growth retardation in rat. *Exp. Toxicol. Pathol.* doi:10.1016/j.etp.2007.05.007, 2007

Dean F, Yu C, Lingas RI and Matthews SG. Prenatal Glucocorticoid modifies hypothalamo-pituitary-adrenal regulation in prepubertal guinea pigs. *Neuroendocrinology* 73: 194-202, 2001

- Dent GW, Smith MA et al.** Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. *Endocrinology* 141(5):1593-1598
- DiFranza JR, Aligne CA, Weitzman M.** Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. *Pediatrics* 113, 1007-1015, 2004
- Dobbing J and Sands J.** Comparative aspects of the brain growth spurt, *Early Hum Dev* 3:79-83, 1979
- Dotsch J et al.** Evidence for change of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity during infancy and childhood. *Pediatr. Res* 48(5): 697-700, 2000
- Eppolito AK and Smith RF.** Long-term behavioral and developmental consequences of pre- and perinatal nicotine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 85: 835-841, 2006
- Falk L, Nordberg A, Seiger A, Kjaeldgaard A and Hellström-Lindahl E.** Smoking during early pregnancy affects the expression pattern of both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors in human first trimester brainstem and cerebellum, *Neuroscience* 132: 389-397, 2005
- Feldmann S and Weidenfeld J.** The excitatory effects of the amygdala on hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses are mediated by hypothalamic norepinephrine, serotonin and CRF-41, *Brain Res Bull* 45(4): 389- 393, 1998
- Granger DA et al.** Individual differences in salivary cortisol and alpha-amylase in mothers and their infants: relation to tobacco smoke exposure. *Developmental Psychobiology* DOI 10.1002/dev, 2007
- Gunnar MR.** Studies of the human infant's adrenocortical response to potentially stressful events. *New Dir Child Dev* 45:3-8, 1989
- Gunnar MR.** Reactivity of the hypothalamic- pituitary- adrenocortical system to stressors in normal infants and children. *Pediatrics* 90(3 Pt 2):491-497, 1992
- Herman JP, Prewitt CM, Cullinan WE.** Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Critical Reviews in Neurobiology.* 10(3-4):371-394, 1996.
- Hoekfelt B.** The effect of smoking on the production of adrenocortical hormones. *Acta. Med. Scand*, Suppl. 369: 123-124, 1961
- Huang ZG, Wang X, Evans C, Gold A, Bouairi E and Mendelowitz D.** Prenatal nicotine exposure alters the types of nicotinic receptors that facilitate excitatory inputs to cardiac vagal neurons. *J. Neurophysiol.* 92: 2548-2254, 2004
- Jacobson L and Sapolsky R.** The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrin. Rev.* 12(2):118-134, 1991

Kable JA , Coles CD, Lynch MR and Carroll J. The impact of maternal smoking on fast auditory brainstem responses. *Neurotoxicology and Teratology* 31: 216-224, 2009

Kahn JP et al. Salivary cortisol: a practical method for evaluation of adrenal function. *Biol. Psychiatry* 23(4):335-349, 1988

Kamendi H, Stephens C, Dergacheva O, Wang X, Huang ZG, Bouairi E, Gorini C, McIntosh JM and Mendelowitz D. Prenatal nicotine exposure alters the nicotinic receptor subtypes that modulate excitation of parasympathetic cardiac neurons in the nucleus ambiguus from primary alpha3beta2 and/or alpha6betaX to alpha3beta4. *Neuropharmacology* 51:60-66, 2006

Kendrick JS and Merritt RK. Woman and smoking: an update for the 1990s. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175:528-535, 1996

Kirkland SA, Dodds LA and Brosky G. The natural history of smoking during pregnancy among women in Nova Scotia. *CMAJ* 163:281-282, 2000

Kirschbaum C and Hellhamer DH. Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology* 22(3):150-169, 1989

Kirschbaum C, Strasburger CJ, Langkrar J. Attenuated cortisol response to psychological stress but not to CRH or ergometry in young habitual smokers, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44:527-531, 1993

Koob GF and Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278: 52-57, 1997

Kvalvik LG, Skjaerven R, Haug K. Smoking during pregnancy from 1999 to 2004: a study from the Medical Birth Registry of Norway. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 87:280-285, 2008

Levine S. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science* 126: 405, 1957

Levitt NS, Lindsay RS et al. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptors gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology* 64(6):412-418, 1996

Lewis M and Ramsay D. Stability and change in cortisol and behavioral response to stress during the first 18 months of life. *Dev. Psychobiol.* 28(8): 419-428, 1995

Liang K, Poytress BS, Chen Y, Leslie FM, Weinberger NM and Metherate R. Neonatal nicotine exposure impairs nicotinic enhancement of central auditory processing and audiotoring learning in adult rats, *Eur. J. Neuroscience* 24: 857-866, 2006

Longo LD. Carbon monoxide: effects of oxygenation of the fetus in utero. *Science*, 194: 523-525, 1976

Luck W, Nau H, Hansen R, Steldinger R. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers, *Dev. Pharmacol. Ther.* 8: 384-395 (1985)

Mackay JEM. The Tobacco Atlas. World Health Organization, Geneva, 2003

Magnano CL, Diamond EJ and Gardner JM. Use of salivary cortisol measurements in young infants: a note of caution. *Child Dev.* 60(5): 1099-1101, 1989

Martin JA, Hamilton BE, Sutton PF, Ventura SJ, Menacker F, Munson ML. Births: final data for 2003. *Natl. Vital Stat. Rep.* 54: 1-116, 2005

Matta SG, Fu Y, Valentine JD, and Sharp BM. Response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in nicotine. *Psychoneuroendocrin.* Vol 23, No.2: 103-113, 1998

Matthews SG. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr. Res* 47(3): 291-300, 2000

Mc Cormick VA, Smythe JW et al. Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rat. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* 84(1): 55-61, 1995

Mc Donald SD, Walkers M, Perkins SL, Beyene J, Murphy K, Gibb W and Ohlsson A. The effects of tobacco exposure on the fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *BJOG* 113: 1289-1295, 2006

Mendelson JH, Sholar MB, Goletiani N Siegel A and Mello NK. Effects of low-and high-nicotine cigarette smoking on mood states and HPA-axis in men. *Neuropsychopharmacology* 30: 1751-1763, 2005

Miao H, Liu C, Bishop K, Gong ZH, Nordberg A and Zhang X. Nicotine exposure during a critical period of development leads to persistent changes in nicotinic acetylcholine receptors of adult rat brain. *Journal of Neurochemistry* 70: 752-762, 1998

Montagos S, Koulouris A and Vagenakis A. A simple stress test for the evaluation of hypothalamic- pituitary-adrenal-axis during the first 6 months of life. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72(1): 214-216, 1991

Nabet C, Ancel PY, Burguet A, Kaminski M. Smoking during pregnancy and preterm birth according to obstetric history: French national perinatal surveys. *Pediatric. Perinat. Epidemiol.* 19:88-96, 2005

O'Regan D, Kenyon CJ et al. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287(5):E863-70, 2004

Pachlopnik Schmid JM, Kuehni CE, Strippoli MP, Roiha HL, Pavlovic R, Latzin P, Gallati S, Kraemer R, Dahinden C, Frey U. Maternal tobacco smoking and decreased leukocytes, including dendritic cells, in neonates. *Pediatr. Res.*61:462-466, 2007

Pauly JR, Slotkin TA. Maternal tobacco smoking, nicotine replacement and neurobehavioral development. *Acta. Paediatr.*, 2008

Peters KL. Neonatal stress reactivity and cortisol. *J. Perinat. Neonatal Nurs* 11(4): 45-59, 1998

Philips DI, Bennett FI, Wilks R, Thame M, Boyne M, Osmond C and Forrester TE. Maternal body composition, offspring blood pressure and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pediatr. Perinat. Epidemiol.*19: 294-302: 2005

Price DA, Close GC and Fielding BA. Age of appearance of circadian rhythm in salivary cortisol values in infancy. *Arch. Dis. Child* 58(6): 454-456, 1983

Rhodes ME, O'Toole SM, Czambel RK and Rubin RT. Male-Female differences in rat hypothalamic- pituitary-adrenal axis responses to nicotine stimulation, *Brain Research Bulletin* Vol. 54, No 6, pp: 681-688, 2001

Rauh M et al. Automated, fast and sensitive quantification of 17alpha-hydroxy-progesteron, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids* 71(6): 450-458, 2006

Rohleder N and Kirschbaum C. The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in habitual smokers, *Int.J.of Psychophysiologie* 59:236-243, 2006

Roy MP, Steptoe A and Kirschbaum C. The association between smoking status and cardiovascular and cortisol stress responsivity in healthy young men. *Int. J. Behav. Med.* 1:264-268, 1994

Santiago LB, Jorge SM and Moreira AC. Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 44(2):157-161, 1996

Sapolsky RM, Romero LM et al. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21(1): 55-89, 2000

Schaeffer L, Müller-Vizentini D, Burkhardt T, Rauh M, Ehlert U and Beinder E, Blunted Stress Response in Small for Gestational Age Neonats, *Pediatric Res* 65: 231-235, 2009

Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming *Eur. J. Endocrinol.* 151, Suppl. 3: U49-62, 2004

Shenassa ED and Brown MJ. Maternal smoking and infantile gastrointestinal dysregulation: the case of colic. *Pediatrics* 114:e497-505, 2004

Stahl F, Amendt P and Dorner G. Total and free cortisol plasma levels in pre- and postnatal life. *Endokrinologie* 74 (2): 243-246, 1979

Stick SM, Burton PR, Gurrin L, Sly PD, LeSouef PN. Effects of maternal smoking during pregnancy and a family history of asthma on respiratory function in newborn infants. *Lancet* 348:1060-1064, 1996

Tizabi Y et al. Hyperactivity induced by prenatal nicotine exposure is associated with an increase in cortical nicotinic receptors. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* Vol 58, No.1, pp. 141-146, 1997

Tizabi Y and Perry DC. Prenatal nicotine exposure is associated with an increase in [¹²⁵I]epibatidine binding in discrete cortical regions in rats. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 67:319-323, 2000

Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R and Schutz G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23: 99-103, 1999

Umeda T. et al. Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clin.Chim. Acta*, 110(2-3):245-53, 1981

Ward AM, Syddall HE, Wood PJ, Chrousos GP and Philips DI. Fetal programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: low birth weight and central HPA regulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:1227-1233, 2004

Warren CW, Jones NR, Eriksen MP and Asma S. Patterns of global tobacco use in young people and implications for future chronic disease burden in adults. *Lancet* 367: 749-753, 2006

Weinstock M, Matlina E et al. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Res* 595(2): 195-200, 1992

Welberg LA, Seckl JR et al. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid-dehydroxygenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behavior in the offspring. *Eur. J. Neurosci.* 12(3): 1047-1054, 2000

Welberg LA, Seckl JR et al. Prenatal glucocorticoid programming of the brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications of behavior. *Neuroscience* 104(1): 71-79, 2001

Woodside DB, Winter K and Fisman S. Salivary cortisol in children: correlations with serum values and effect of psychotropic drug administration. *Can J Psychiatry* 36(10):746-748, 1991

Yang K, Laura J, Fran R, Anju S and Haiyan G. Cadmium reduces 11-beta-hydroxysteroid-dehydroxygenase type 2 activity and expression in human placental trophoblast cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: E135-E142, 2006.

7 Dank

Ich möchte mich ganz herzlich bei PD Dr.med. Leonhard Schäffer für die ausserordentliche, motivierende und zuverlässige Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation bedanken! Und die Geduld und Zeit, die er dafür aufbrachte! Bedanken will ich mich auch für den lehrreichen Einblick in die Domäne der Forschung und vor allem auch seinen Einsatz als Mentor im Hinblick auf meine ärztliche Laufbahn. Vielen Dank für alles.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. med. Ernst Beinder, Charité Berlin, bis 2010 Universitätsspital Zürich, für das ermöglichen dieser Dissertation und sein Interesse im Verlauf bedanken. Auch ein Dankeschön an Prof. Dr. med. R. Zimmermann, für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Einen grossen Dank geht an Dr.med. Tilo Burkhardt für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten sowie bei der Erstellung der Illustrationen. Danke für die gute Zusammenarbeit! Zudem geht mein Dank an Dr.med.Manfred Rauh für die Bestimmung der Speichelsamples.

Vielen, vielen Dank meiner Vordoktorandin Sina Schmidt für die Einschleusung in dieses spannende Studienfeld, die tolle Einarbeitung und die Unterstützung.

Ein ebenso wichtiges Dankeschön geht an die Pflegefachfrauen auf den Wochenbettstationen, die durch Ihre Zusammenarbeit den reibungslosen und korrekten Ablauf des Guthrie-Testes und der Probeentnahmen ermöglichten.

Einen grossen Dank gilt natürlich allen Müttern, die es uns erlaubten, ihre neugeborenen Kinder in diese Studie aufzunehmen!

Ein Dankeschön geht an die Mitarbeiter in der Forschungsabteilung der Frauenklinik, die mir halfen, mich zurecht zu finden. Es war immer eine spannende Abwechslung mit interessanten Gesprächen.

Dank auch an meine Familie, die mir mein Wunsch-Studium ermöglichte und mich emotional wie auch finanziell während dieses langen Weges ununterbrochen unterstützte.

8 Lebenslauf

Name/Vorname: Helene Bamert

Geburtsdatum: 08. September 1981

Geburtsort: Zürich

Bürgerort: Thalwil ZH und Tuggen SZ

Schulische und Universitäre Ausbildung

10/2011	Eidg. Examen Humanmedizin Universität Zürich
10/2004 – 11/2011	Universität Zürich: Humanmedizin
10/2003 – 10/2004	ETH Zürich: pharmazeutische Wissenschaften
08/1997 – 01/2002	Gymnasium Enge, Zürich: Matura Typus D
05/1988 – 06/1997	Primar und Sekundarschule Thalwil

Teilzeitjobs

10/2003 – 10/2011	<p>Pflegepraktikum danach Pflegehelferin im Universitätsspital Zürich, (Innere Medizin)</p> <p>-> Umgang mit kranken Menschen, Einschätzung krankheitsbedingter Einschränkungen</p>
10/1998 – 02/2004	<p>Sportartikelverkäuferin, Jelmoli</p> <p>-> Erlernen wirtschaftlichen/unternehmerischen Denkens und Handelns, sowie kundenorientierter Kommunikation</p>

Vereinsaktivitäten

06/2007 – 10/2011	<p>Achtung Liebe (Sexualaufklärung inkl. Verhütungsaufklärung in Schulklassen)</p> <p>-> Sprechen vor Publikum, Tabuthemen ansprechen, Gynäkologische Beratungen</p>
11/2004 – 10/2011	<p>SwiMSA (Swiss Medical Student Association) Exchanges (auch: ifmsa) internationaler, professioneller Studentenaustausch</p> <p>-> Kommunikation, internationaler Wissens- und Kulturaustausch, Organisation von Praktika und Socialprogrammen</p>

Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift, Sprachaufenthalte
Französisch	Gute Kenntnisse in Wort und Schrift, Matura Typus D
Spanisch	Gute Kenntnisse in Wort und Schrift, Matura Typus D, Sprachaufenthalte
Portugiesisch	Grundkenntnisse in Wort und Schrift, Sprachaufenthalt